DER STOFFWECHSEL VON GLUCOSE, FRUCTOSE UND SACCHAROSE IN RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA UND RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Ralf Conrad
aus Münchberg/Ofr.

Göttingen 1976

DER STOFFWECHSEL VON GLUCOSE, FRUCTOSE UND SACCHAROSE IN RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA UND RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Ralf Conrad
aus Münchberg/Ofr.

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München durchgeführt und durch ein Doktorandenstipendium gefördert.

UNIV. LEIDEN BIBL.

D7

Referent: Prof.Dr. H.G. Schlegel
Korreferent: Prof.Dr. N. Pfennig

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.1976

ABKÜRZUNGEN

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute (Impulse pro min)
-DH	-Dehydrogenase
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
dpm	desintegrations per minute (Zerfälle pro min)
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
ED	Entner-Doudoroff
EM	Embden-Meyerhof
F-6-P	Fructose-6-phosphat
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
KDG	2-Keto-3-deoxy-gluconat
KDPG	2-Keto-3-deoxy-gluconat-6-phosphat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Lsg.	Lösung
MNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin
mod.	modifiziert
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
n.n.	nicht nachweisbar
PP	Pentosephosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphotransferasesystem
PFK	Phosphofructokinase
PH-Agar	Pepton-Hefeextrakt-Agar (0,3% Pepton, 0,3% Hefeextrakt)
PHB	Poly-ß-hydroxybutyrat
6PG	6-Phosphogluconat
PGI	Phosphoglucoseisomerase

Rps.	Rhodopseudomonas
Rsp.	Rhodospirillum
spez.	spezifisch
TEA	Triäthanolamin-hydrochlorid
TIM	Triosephosphatisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TCC	Tricarbonsäurecyclus
vgl.	vergleiche
Upm	Umdrehungen pro min

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
METHODEN	4
ERGEBNISSE	28
1. Der Abbau von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas capsulata	28
1.1. Enzyme der Hexoseabbauwege	28
1.2. Nachweis eines PEP-Fructose-Phosphotransferasesystems	31
1.3. Assimilation von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas capsulata	36
1.4. Glucose$^-$-Mutanten von Rhodopseudomonas capsulata	38
1.5. Einbau von ^{14}C-Glucose- und Fructose in das Ausscheidungsprodukt Pyruvat und Lokalisierung der Radioaktivität im Molekül	42
1.6. Radiorespirometrische Versuche	52
2. Der Abbau von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas sphaeroides	58
2.1. Enzymatische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023	58
2.2. Radiorespirometrische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023	60
2.3. Enzymatische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 1760-1	63
2.4. Radiorespirometrische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 1760-1	64
2.5. Wachstumsversuche mit Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023 und 1760-1	66
2.6. Abbau von Fructose in Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023 unter phototrophen Bedingungen	69

Seite

3. Der Abbau von Saccharose in Rhodopseudomonas capsulata 74

3.1. Enzymatische Untersuchung 75
3.2. Lokalisierung der Saccharaseaktivität in der Zelle 77
3.3. Assimilation von Glucose und Fructose in Saccharose-zellen 81

4. Die Regulation des Glucose- und Fructosestoffwechsels in Rhodopseudomonas capsulata 83

4.1. Diauxie mit Glucose und Fructose als Wachstums-substrat 83
4.2. Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 88
4.3. Regulation der 1-Phosphofructokinase 91

DISKUSSION 94

1. Der Abbau von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas capsulata und Rhodopseudomonas sphaeroides 94
2. Der Abbau von Saccharose in Rhodopseudomonas capsulata 103
3. Die Regulation des Glucose- und Fructosestoffwechsels in Rhodopseudomonas capsulata 107

ZUSAMMENFASSUNG 113

LITERATUR 114

EINLEITUNG

Dem Thema Zuckerstoffwechsel wird in fast jedem Biochemielehrbuch viel Platz eingeräumt. In der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts konzentrierte sich die Forschung in erster Linie auf die Probleme des Zuckerstoffwechsels. Auch heute noch nimmt die Arbeit am Zuckerstoffwechsel eine zentrale Stellung ein, z.B. bei der Aufklärung der Mechanismen des Substrattransports und bei der Erforschung der Regulation von katabolischen Stoffwechselwegen. Die wichtigsten Zuckerabbauwege sind bekannt und in ihren einzelnen Reaktionsschritten verhältnismäßig gut untersucht. Man unterscheidet heute drei Hauptabbauwege, in denen die Zucker umgesetzt werden: den Embden-Meyerhof(EM)-Weg, den Entner-Doudoroff(ED)-Weg und den Pentosephosphat(PP)-Weg. Der Begriff Embden-Meyerhof-Weg wird in der vorliegenden Arbeit im Sinne des Hexoseabbaus über Fructose-1,6-diphosphat gebraucht.

Für gewöhnlich besitzt ein Mikroorganismus nicht nur einen der drei Wege, sondern benutzt für den Abbau einer Hexose eine Kombination aus EM- + PP-Weg oder ED- + PP-Weg (Wang et al. 1958). Daß beim Abbau einer Hexose alle drei Abbauwege gleichzeitig beteiligt sind, oder eine Kombination von EM- + ED-Weg vorliegt, ist jedoch noch nicht nachgewiesen worden. Dagegen ist der Abbau von Glucose über den EM-Weg einerseits und der von Gluconat über den ED-Weg andererseits nicht selten, z.B. bei Beneckea (Pseudomonas) natriegens (Eagon und Wang 1962), Escherichia coli (Eisenberg und Dobrogosz 1967) und anderen Bakterien (Anderson und Wood 1969). Daß in einem Organismus Glucose über den einen und Fructose über einen anderen Abbauweg umgesetzt wird, wurde bisher noch nicht nachgewiesen; stets wurden die beiden Hexosen Fructose und Glucose entweder über den EM-Weg oder den ED-Weg abgebaut. Der EM-Weg kann dabei aber in zwei verschiedenen Modifikationen auftreten, je nachdem ob die Hexose über Fructose-6-phosphat oder Fructose-1-phosphat abgebaut wird. Entsprechend ist das Schlüsselenzym des EM-Weges im einen Fall die 6-Phosphofructokinase (6-PFK) und im anderen Fall die 1-Phosphofructokinase (1-PFK). Die 1-PFK wurde erstmals in Fructose gewachsenen Zellen von Aerobacter aerogenes nachgewiesen (Hanson

und Anderson 1966). Dieser Organismus benutzt für den Fructoseabbau den EM-Weg über F-1-P, für den Glucoseabbau dagegen den EM-Weg über F-6-P (Sapico et al. 1968).

Phototrophe Bakterien haben die Fähigkeit, mit Hilfe von Lichtenergie ATP zu bilden. Sie benötigen deshalb im Licht organische Substrate nicht als Energiequelle, sondern lediglich als Kohlenstoff- oder Elektronendonatoren. Vertreter der Familie der Rhodospirillaceae vermögen außerdem aerob im Dunkeln zu wachsen; unter diesen Bedingungen werden die Substrate zur Energiegewinnung veratmet. Für heterotrophe Bakterien sind Zucker in der Regel gute und leicht abbaubare Substrate, welche anderen Substraten oft sogar vorgezogen werden. Diese Bevorzugung der Zucker wird mit Hilfe von teilweise sehr komplexen Regulationsmechanismen erreicht (Paigen und Williams 1970). Für phototrophe Bakterien dagegen sind Zucker generell schlechte Substrate. Nur wenige Arten können Glucose oder Fructose verwerten (Van Niel 1944, Thiele 1968), und meistens ist diese Fähigkeit kein allgemeines Artmerkmal, sondern ist auf einzelne Stämme beschränkt. Es ist deshalb nicht erstaunlich, daß bisher über den Zuckerstoffwechsel der phototrophen Bakterien nur wenig bekannt ist.

Rhodopseudomonas capsulata, Rps.sphaeroides und Rhodospirillum rubrum wachsen auf Zuckern mit einer relativ kurzen Verdoppelungszeit (t_d<10 Std.), wobei Rsp.rubrum nur mit Fructose, die beiden anderen Arten auch mit Glucose wachsen. Nach radiorespirometrischen Untersuchungen baut Rsp.rubrum Fructose über den EM-Weg ab (Gibson und Wang 1968). Rps.capsulata setzt Glucose über den ED-Weg um (Eidels und Preiss 1970). Für Rps.sphaeroides liegen bislang nur enzymatische Untersuchungen vor (Szymona und Doudoroff 1960), deren Ergebnisse ebenfalls einen Hexoseabbau über den ED-Weg nahelegen. Der Fructosestoffwechsel wurde dabei jedoch nicht näher untersucht. Der Nachweis eines Phosphoenolpyruvat-Fructose-Phosphotransferasesystems, das Fructose in 1-Stellung phosphoryliert, in Rsp.rubrum und Rps.sphaeroides (Saier et al.1971) und der Nachweis einer 1-Phosphofructokinase für einige Vertreter der phototrophen Bakterien (Conrad 1973) ließ vermuten,

daß Fructose eventuell über den EM-Weg mit 1-PFK als Schlüsselenzym abgebaut wird.

Es besteht also die Möglichkeit, daß sowohl Rps.capsulata als auch Rps.sphaeroides die beiden Hexosen Glucose und Fructose über verschiedene Wege abbaut, nämlich über den ED-Weg und den EM-Weg. Für die vorliegende Arbeit ergaben sich demnach folgende Fragen:

1. Baut Rps.capsulata Fructose tatsächlich über den EM-Weg ab?
2. Über welche Wege werden Glucose und Fructose in Rps.sphaeroides abgebaut?
3. Auf welchem Weg wird Saccharose, auf der Rps.capsulata zu wachsen vermag, abgebaut, d.h. wie werden die Bestandteile des Saccharosemoleküls, Glucose und Fructose, abgebaut?
4. Wenn Fructose und Glucose tatsächlich über verschiedene Wege abgebaut werden, wie wird dann der Abbau der beiden Zucker reguliert, wenn sie dem Organismus gleichzeitig angeboten werden?

METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchung wurde mit Bakterienstämmen aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) durchgeführt:

Rhodopseudomonas capsulata Kb1	DSM Nr. 155
Rhodopseudomonas sphaeroides 17023	DSM Nr. 158
Rhodopseudomonas sphaeroides 1760-1	DSM Nr. 159

2. Nährlösung

Zur Anzucht der Mikroorganismen wurde eine Mineralnährlösung folgender Zusammensetzung verwendet (Pfennig 1969):

KH_2PO_4	12 mM
NH_4Cl	10 mM
$MgSO_4$	2 mM
NaCl	7 mM
$CaCl_2$	0,35 mM
SL4 (10-fach) pro Liter	1 ml

End-pH-Wert 6,9

Die Spurenelementlösung SL4 wurde nach Pfennig und Lippert (1966) 10-fach konzentriert angesetzt. Die Mineralnährlösung enthielt außerdem Thiamin (0,1 mg/l) oder Hefeextrakt (0,01 bzw. 0,05%).

Die organischen Substrate wurden autoklaviert (Na-DL-Malat) oder sterilfiltriert (D-Glucose, D-Fructose, Saccharose, Na-Pyruvat) nach dem Autoklavieren der Mineralnährlösung in einer Konzentration bis zu 20 mM zugegeben.

3. Stammkulturen

Die Stammkulturen wurden bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt und waren über Monate lebensfähig. Die Bakterien wurden etwa alle zwei Monate in frisches Mineralmedium mit 5 mM Malat als Substrat überimpft und in 50 oder 100 ml Schraubdeckelflaschen anaerob im Licht bebrütet.

4. Reinheitskontrollen

Reinheitskontrollen wurden regelmäßig nach jeder Anzucht vorgenommen. Hierzu wurden die Kulturen mikroskopisch auf Verunreinigungen überprüft. Außerdem wurde eine Probe auf Agarplatten mit 0,3% Pepton und 0,3% Hefeextrakt als Substrat (PH-Agar) ausgestrichen und aerob im Dunkeln oder anaerob im Licht bei 30°C bebrütet. Die Platten wurden auf ein einheitliches Koloniebild überprüft. Als alternativer Reinheitstest wurde eine Probe in ein Röhrchen mit halbflüssigem Bacto-AC-Medium überimpft und auf heterotrophes Dunkelwachstum geprüft.

5. Kulturverfahren

Die Bebrütungstemperatur betrug 28-30°C.

5.1. Anzucht von Zellmaterial

Die phototrophe Anzucht von Bakterien erfolgte in 100 bzw. 500 ml Schraubdeckelflaschen, die mit Nährlösung bis auf eine Luftblase gefüllt waren, vor einer Glühbirne (100 W) bei 1000-2000 Lux. Zur Anzucht von phototrophen Massenkulturen dienten vollgefüllte Glasflaschen (5 l), die mit einem Gummistopfen verschlossen waren. Die Flaschen wurden mit zwei Philipps Atralux-Lampen (100 W) bei ca. 3000-4000 Lux beleuchtet.
Die aerobe Anzucht der Bakterien wurde in Erlenmeyerkolben mit Schikanen (2 l) vorgenommen; die Kolben enthielten bis zu 500 ml Nährlösung und wurden auf dem Kreisschüttler bei 150 Upm geschüttelt.

5.2. Turbidimetrische Erfassung des Wachstums

Einfache Wachstumsversuche zur Messung der Trübungszunahme wurden in Schraubdeckelröhrchen (20 ml) durchgeführt. Vorbereitung und Wachstumsbedingungen waren die gleichen wie für die Versuche in Schraubdeckelflaschen. Die Trübung konnte direkt in einem Photometer (Spectronic 70 der Fa.Bausch & Lomb) gegen ein Referenzröhrchen mit Wasser gemessen werden. Die Abweichung der Trübung in den einzelnen Röhrchen auf Grund unterschiedlicher Glasbeschaffenheit betrug maximal $\pm$ 0,02 Extinktionseinheiten. Die direkt gemessene Trübung wurde mit Hilfe einer Eichkurve für

jeden Organismus korrigiert und ergab dann einen Trübungswert, wie er nach Verdünnung der Suspension auf weniger als 0,3 Extinktionseinheiten in einer Küvette (1 cm Lichtweg) im selben Photometer gemessen worden wäre.

5.3. Bestimmung verschiedener Wachstumsparameter

Wachstumsversuche unter phototrophen Bedingungen wurden in Flaschen oder Rundkolben mit Begasungsaufsatz und Kanüle bei einer Beleuchtungsstärke von 3000-4000 Lux durchgeführt. Um die Kultur anaerob zu halten, wurde mit N_2 begast. Proben wurden mit Hilfe einer Kanüle entnommen und sofort in Eis gekühlt. Nach Messung der Trübung und des pH-Wertes wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Überstehende und das Sediment wurden eingefroren und bis zur Substrat- bzw. Proteinbestimmung bei -30°C aufbewahrt. Für Wachstumsversuche unter aeroben Bedingungen wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet.

6. Ausscheidungsversuche

Es wurde versucht, die Bedingungen zu ermitteln, unter denen Rps.capsulata mit Hexose als Substrat Pyruvat oder Lactat ausscheidet. Unter phototrophen Bedingungen wurde der Versuch in Erlenmeyerkolben (100 ml) durchgeführt, die mit Serumkappen verschlossen und mit einem N_2-Strom anaerob gehalten wurden. Die Erlenmeyerkolben wurden bei 30°C in einem thermokonstanten Wasserbad mit 75 Upm reziprok geschüttelt und mit ca.6000 Lux von unten beleuchtet. Es wurde hierfür das Wasserbad einer Rundwarburgapparatur (Fa.Braun, Melsungen) verwendet, das mit einer Beleuchtungseinrichtung bestehend aus 14 Glühbirnen (je 40 W) ausgestattet ist. Bei Versuchen unter aeroben Bedingungen wurden Erlenmeyerkolben (250 ml) verwendet, die auf dem Kreisschüttler bei 150 Upm geschüttelt wurden. Die für die Ausscheidungsversuche verwendeten Zellen wurden in 12 mM $NaKPO_4$-Puffer pH 6,9 suspendiert; Wachstum war somit nicht möglich. Die Erlenmeyerkolben enthielten:

30 ml Zellsuspension, E_{650}=6, in 12 mM $NaKPO_4$-Puffer pH 6,9 mit ca. 300 µmole Glucose oder Fructose.

Vor der Substratzugabe wurde 30 min vorinkubiert mit:
24 µmole Na-Fluoracetat (Endkonzentration 0,8 mM) oder
150 µmole Na-Arsenit (Endkonzentration 5 mM).
Während des Versuchs wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand nach Messung des pH-Wertes bis zur Substratbestimmung eingefroren aufbewahrt. In einigen Fällen sank der pH-Wert während des Versuchs stark ab und mußte mit 30-50 µl 1N NaOH korrigiert werden.

7. Messung des Bakterienwachstums

7.1. Trübungsmessung

Die Trübung von Zellsuspensionen wurde bei 650 nm, Schichtdicke 1 cm, im Photometer (Spectronic 70, Fa.Bausch & Lomb) gemessen. Überstieg die Extinktion E_{650}=0,3 , so wurden die Proben entsprechend verdünnt.

7.2. Zellzahlbestimmung

Die Gesamtzellzahl einer Bakteriensuspension wurde durch Auszählen in der Neubauerschen Zählkammer bestimmt.

7.3. Proteinbestimmung an ganzen Zellen

Der Proteingehalt ganzer Zellen wurde mit einer von Schmidt et al.(1963) modifizierten Methode von La Riviere (1958) bestimmt.

8. Bestimmung von Substraten

8.1. Glucose

Zur Bestimmung von Glucose wurden zwei Methoden angewendet:
a) die Glucose-Oxidase (GOD)-Methode mit Hilfe des Reagenziensatzes zur Blutzuckerbestimmung der Fa.Boehringer, Mannheim,
b) die enzymatische Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-DH nach der Vorschrift von Boehringer (1972).

8.2. Fructose

Zur Bestimmung von Fructose wurden ebenfalls zwei Methoden angewendet:
a) die Bestimmung mit dem Resorcin-Thioharnstoff-Reagenz nach Dische (1962),

b) die enzymatische Bestimmung nach Boehringer (1972); diese Bestimmung entspricht der enzymatischen Glucosebestimmung, enthält aber Phosphoglucoseisomerase als zusätzliches Enzym.

8.3. Saccharose

Saccharose wurde mit ß-Fructosidase gespaltet, und das Spaltprodukt Glucose wurde enzymatisch mit Hexokinase und G-6-P-DH bestimmt (Boehringer 1972).

8.4. Citrat, Acetat, Pyruvat, L- und D-Lactat

Citrat wurde enzymatisch mit Citrat-Lyase, Malat-DH und Lactat-DH als Hilfsenzymen bestimmt. Acetat wurde mit Hilfe von Acetat-Kinase und Hydroxylamin in Acethydroxamsäure überführt und mit $FeCl_3$ als Farbkomplex bei 492 nm gemessen. Pyruvat und L-Lactat wurden mit L-Lactat-DH , D-Lactat mit D-Lactat-DH als Hilfsenzym bestimmt. Alle Bestimmungen wurden nach den Vorschriften von Boehringer (1972) ausgeführt.

9. Isolierung von Mutanten

Zur Isolierung von Mutanten von Rps.capsulata, die zwar noch mit Fructose, aber nicht mehr mit Glucose zu wachsen vermögen, wurde nach den Angaben von Marrs et al.(1972) vorgegangen:
Eine aerob mit Glucose gewachsene Kultur wurde in der log-Phase geerntet, gewaschen und zu 10^9 Zellen/ml in Mineralnährlösung suspendiert. Zur Mutationsauslösung wurde MNG (1mg/ml) zugesetzt und 30 min bei 30^oC inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal gewaschen und im doppelten Volumen Mineralnährlösung mit 0,1% Hefeextrakt und 20 mM Pyruvat resuspendiert. Die Suspension wurde auf 5 Erlenmeyerkölbchen aufgeteilt und zur Ausprägung der Mutation aerob auf dem Kreisschüttler 60 Std. bei 150 Upm inkubiert; nach dieser Zeit war die stationäre Wachstumsphase erreicht, und die Zellzahl betrug ca.$7x10^9$ Zellen/ml. Die Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert, zweimal gewaschen und in Mineralnährlösung mit Thiamin zu je ca.$2x10^8$ Zellen/ml resuspendiert. Diese Suspensionen wurden in Erlenmeyerkölbchen 7,5 Std. lang geschüttelt, um die Zellen an Reservestoffen zu verarmen. Dann wurde je 25 mM Glucose zugegeben und

weitere 5 Std. geschüttelt. Schließlich wurde Penicillin (160 E/ml) zugesetzt und 20 Std. unter Schütteln inkubiert. Wildtypzellen, die noch mit Glucose wachsen können, sollten hierbei abgetötet werden. Zur Isolierung der Glucose$^-$-Mutanten wurde die Pinpoint-Technik benutzt. Hierzu wurden die Suspensionen abzentrifugiert, zweimal gewaschen und mit Mineralnährlösung zum Ausgangsvolumen resuspendiert. Diese Suspensionen und eine 1:10-Verdünnung wurden auf Agarplatten ausgespatelt, die als Substrat 25 mM Glucose + 0,2 mM Pyruvat bzw. 25 mM Glucose + 0,2 mM Fructose enthielten. Die Platten wurden 9 Tage aerob inkubiert. Die Zahl der überlebenden Bakterien betrug in den Suspensionen ca.10^4 Zellen/ml. Kleine Pinpoint-Kolonien (510 Stück) wurden mit Zahnstochern von den Platten abgepickt und auf PH-Agar übertragen (Master-Platten). Nach 3 Tagen aerober Bebrütung wurde mit Samt-Stempeln auf Agarplatten überstempelt, die als Substrat entweder 0,3% Pepton + 0,3% Hefeextrakt oder 20 mM Glucose, Fructose oder Pyruvat enthielten, und aerob bebrütet. Kolonien, die auf Glucoseplatten nicht zur Entwicklung kamen, aber auf Pyruvat wuchsen, wurden von der Master-Platte abgeimpft und auf PH-Agarplatten gereinigt. Anschließend wurden die gereinigten Stämme auf Mineralagarplatten mit Glucose, Fructose, Saccharose und Pyruvat sektorenförmig ausgestrichen. Die Platten wurden sowohl aerob im Dunkeln als auch anaerob im Licht (Wittscher Topf mit N_2-Atmosphäre) bebrütet. Danach konnten 4 Stämme als Mutanten verifiziert werden, die mit Glucose und Saccharose nicht mehr wachsen konnten, aber Fructose und Pyruvat verwerteten.

10. Herstellung zellfreier Extrakte

Die für enzymatische Untersuchungen benötigten Zellen wurden gegen Ende der log-Phase geerntet, gewaschen und in 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6 zu einer Trübung von E_{650}=50-200 resuspendiert und bei -30°C aufbewahrt. Die Zellen wurden durch Ultraschall (2-3 min/5 ml) mit einem Braun Sonic 300 Ultraschallgerät (Fa. Quigley, Rochester) oder durch eine einmalige Passage durch eine Frenchpresse (Aminco, USA) bei 80 kp/cm^2 aufgeschlossen. Anschließend wurde der Rohextrakt 30 min bei 20 000 x g und 90 min bei 120 000 x g zentrifugiert. Das Überstehende wurde mit Hilfe einer

Sephadex G25-Säule (1 Volumen Extrakt/ 2 Volumen Säulenbett, Fa. Pharmacia, Upsala), die gegen 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6 äquilibriert war, von niedermolekularen Substanzen befreit (G25-Extrakt). Dieser G25-Extrakt wurde für die enzymatischen Untersuchungen verwendet.

Für die enzymatische Untersuchung des PEP-Fructose-PTS wurden die Zellen in 2 mM KPO_4-Puffer pH 7, 140 mM KCl, 1 mM DTE suspendiert. Nach Aufschließen der Zellen wurde 15 min bei 2 000 x g zentrifugiert (Rohextrakt). Zur Fraktionierung des Rohextrakts wurde das Überstehende 2 Std. bei 200 000 x g zentrifugiert und das Sediment in 2 mM KPO_4-Puffer pH 7, 140 mM KCl, 1 mM DTE suspendiert (Pelletfraktion und lösliche Fraktion).

11. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al.(1951). In Extrakten, die Dithioerythritol enthielten, wurde das Protein vor der Bestimmung mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 4%) gefällt. In allen anderen Extrakten konnte die Proteinbestimmung ohne vorherige Fällung erfolgen, da der verwendete KPO_4-Puffer im Gegensatz zu TEA- oder Tris-Puffer nicht mit dem Lowry-Reagenz reagiert.

12. Präparation von Protoplasten

Von aerob mit Saccharose gewachsenen Zellen von Rps.capsulata wurden nach einer Methode von Karunairatnam et al.(1958) Protoplasten hergestellt. Hierzu wurde eine eingefrorene Zellsuspension in 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6 , 1 M Mannit, 50 mM $MgSO_4$ bis zu einer Trübung von E_{650}= 6,5 verdünnt. Es wurden 0,05% Lysozym und 0,32% EDTA pH 7 (Endkonzentrationen) zugesetzt und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Suspension bestand danach hauptsächlich aus Protoplasten, welche bei Weglassen von $MgSO_4$ oder durch Verdünnung mit Puffer ohne Mannit lysierten.

Um die periplasmatische Fraktion zu erhalten, wurden die Protoplasten 30 min bei 15 000 x g abzentrifugiert. Das Überstehende (periplasmatische Fraktion) wurde zur Bestimmung von En-

zymen eingesetzt, indem der Puffer des Testansatzes teilweise durch die periplasmatische Fraktion ersetzt wurde. Das Pellet wurde in 3 ml 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6 unter Zusatz von DNase mit einem Homogenisator resuspendiert und 5 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 30 min bei 20 000 x g zentrifugiert und das Überstehende (cytoplasmatische Fraktion) für Enzymtests verwendet.

13. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die enzymatischen Untersuchungen wurden innerhalb von 24 Std. nach Präparation des G25-Extrakts durchgeführt. Die Extrakte besaßen einen Proteingehalt von 2-10 mg/ml. Die Extinktionsänderung wurde bei 366 nm in einem Zeiss-Photometer PM6 gemessen und mit einem Kompensationsschreiber (Servogor S) registriert. Die Meßtemperatur betrug 25°C. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bis zu einer Extinktionsänderung von maximal 0,1 Einheiten/min. Bei allen Tests wurden Kontrollen durch Weglassen der einzelnen Substrate und des Extrakts gemacht. Die Substratkonzentrationen waren für die jeweilige Reaktion sättigend. Die Extraktproportionalität wurde überprüft. Die spezifische Aktivität wird in Millieinheiten pro mg Protein (mE/mg) angegeben; eine Millieinheit ist der Umsatz von 1 nmol Substrat pro min (25°C).

Glucokinase (Hexokinase(EC 2.7.1.1)-Test nach Boehringer 1961, EC 2.7.1.2 Blackkolb 1968)

1,79 ml	50 mM TEA-Puffer pH 7,6
0,60 ml	Glucose-Lsg.(200 mg/ml)
0,20 ml	100 mM $MgCl_2$
0,20 ml	15 mM $NADP^2$
0,10 ml	15 mM ATP
0,01 ml	G-6-P-DH (1mg/ml)
0,10 ml	Extrakt

Fructokinase (Hexokinase-Test nach Boehringer 1961, Blackkolb 1968)

EC 2.7.1.4

1,79	ml	50 mM TEA-Puffer pH 7,6
0,60	ml	Fructose-Lsg.(200 mg/ml)
0,20	ml	100 mM $MgCl_2$
0,20	ml	15 mM $NADP^2$
0,10	ml	15 mM ATP
0,01	ml	G-6-P-DH (1mg/ml)
0,005	ml	PGI (2mg/ml)
0,10	ml	Extrakt

Saccharase (Hexokinase-Test nach Boehringer 1961, Blackkolb 1968)

EC 3.2.1.26

1,77	ml	50 mM TEA-Puffer pH 7,6
0,60	ml	Saccharose-Lsg.(200 mg/ml)
0,20	ml	100 mM $MgCl_2$
0,20	ml	15 mM $NADP^2$
0,10	ml	15 mM ATP
0,02	ml	HK (2mg/ml)
0,01	ml	G-6-P-DH (1mg/ml)
0,005	ml	PGI (2mg/ml)
0,10	ml	Extrakt

Saccharase wurde entsprechend wie Fructokinase unter Zusatz von Hexokinase getestet. Bei Weglassen von Phosphoglucoseisomerase erfolgte die Reaktion mit halber Geschwindigkeit. Wurde die Hexokinase erst einige Minuten nach Mischen der anderen Komponenten zugegeben, so erfolgte zuerst eine schnelle Reaktion, in der die durch die Saccharasereaktion bereits gebildete Glucose und Fructose abreagierten, bis die Spaltung der Saccharose wieder geschwindigkeitsbegrenzend wurde.

Phosphofructomutase (Phosphoglucomutase(EC 2.7.5.1)-Test mod. nach Bergmeyer et al.1974)

2,58	ml	50 mM TEA-Puffer pH 7,6
0,005	ml	20 mM FDP
0,20	ml	20 mM EDTA pH 7
0,05	ml	100 mM $MgCl_2$
0,05	ml	15 mM $NADP^2$
0,10	ml	100 mM F-1-P
0,01	ml	G-6-P-DH (1mg/ml)
0,005	ml	PGI (2mg/ml)
0,10	ml	Extrakt

Der Test wurde außerdem mit 50 mM TEA-Puffer pH 8, 100 mM Tris-Puffer pH 8,8 und unter Weglassen von EDTA durchgeführt.

Phosphoglucoseisomerase (Boehringer 1961, Blackkolb 1968)

EC 5.3.1.9

2,54 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,20 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,10 ml	15 mM	$NADP^+$
0,10 ml	100 mM	F-6-P
0,01 ml		G-6-P-DH (1mg/ml)
0,05 ml		Extrakt

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (mod. nach Blackkolb und Schlegel 1968)

EC 1.1.1.49

2,60 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,10 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,10 ml	15 mM	$NADP^+$ bzw. NAD
0,10 ml	120 mM	G-6-P
0,10 ml		Extrakt

6-Phosphogluconat-Dehydratase + KDPG-Aldolase (Gottschalk et al. 1964)

2,63 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,10 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,10 ml	15 mM	$NADH^+$
0,02 ml		LDH (5mg/ml)
0,05 ml		Extrakt
0,10 ml	25 mM	6PG

Die Aktivität wurde ca.10 min nach Substratzugabe ermittelt, da der Extinktionsabfall in den ersten Minuten nicht geradlinig war.

6-Phosphogluconat-Dehydratase (mod. nach Blackkolb und Schlegel 1968)

EC 4.2.1.12

0,855 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,030 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,020 ml	15 mM	$NADH^+$
0,015 ml		KDPG-Aldolase (60 E/ml)
0,010 ml		LDH (5mg/ml)
0,050 ml	25 mM	6PG
0,020 ml		Extrakt

KDPG-Aldolase (mod. nach Blackkolb und Schlegel 1968)

EC 4.1.2.14

0,825 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,030 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,020 ml	15 mM	$NADH^+$
0,005 ml		LDH (5mg/ml)
0,100 ml	4 mM	KDPG
0,020 ml		Extrakt

KDG-Kinase (mod. nach Andreesen und Gottschalk 1969)

EC 2.7.1.45

0,725 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,030 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,020 ml	15 mM	$NADH^2$
0,010 ml		LDH (5mg/ml)
0,100 ml	60 mM	KDG
0,050 ml		Extrakt
0,015 ml		KDPG-Aldolase (60 E/ml)
0,050 ml	30 mM	ATP

KDG ergab mit Extrakt und LDH eine Blindreaktion, die nach einigen Minuten zum Stillstand kam. Es mußte deshalb mit ATP gestartet werden. Nochmalige Zugabe von Extrakt ergab keine Blindreaktion mehr, aber die doppelte Reaktionsgeschwindigkeit. Eine spätere Zugabe von GDH/TIM ergab zuerst eine schnelle Reaktion (Abreagieren von GAP), die dann langsam wieder linear wurde und mit doppelter Rate ablief.

6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Boehringer 1966, Bowien 1970)

EC 1.1.1.44

2,55 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,20 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,10 ml	15 mM	$NADP^2$ bzw. NAD
0,05 ml		Extrakt
0,10 ml	25 mM	6PG

6-Phosphofructokinase bzw. 1-Phosphofructokinase (mod. nach Ling et al.1955)

EC 2.7.1.11 EC 2.7.1.56

2,34 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 8
0,09 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,20 ml	100 mM	reduziertes Glutathion
0,05 ml	15 mM	NADH
0,01 ml		Aldolase (2mg/ml)
0,02 ml		GDH/TIM (2mg/ml)
0,10 ml	30 mM	ATP
0,10 ml	100 mM	F-6-P bzw. 10 mM F-1-P
0,10 ml		Extrakt

FDP-Aldolase (mod. nach Boehringer 1964)

EC 4.1.2.13

2,73 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 7,6
0,05 ml	15 mM	NADH
0,02 ml		GDH/TIM (2mg/ml)
0,10 ml		Extrakt
0,10 ml	20 mM	FDP

FDPase (mod. nach Racker und Schroeder 1958)

EC 3.1.3.11

2,47	ml	100 mM Tris-Puffer pH 8,8
0,10	ml	20 mM EDTA
0,10	ml	100 mM $MgCl_2$
0,10	ml	15 mM $NADP^2$
0,02	ml	G-6-P-DH (1mg/ml)
0,005	ml	PGI (2mg/ml)
0,10	ml	100 mM FDP
0,10	ml	Extrakt

14. Messung des PEP-Fructose-Phosphotransferasesystems

Der Testansatz enthielt außer dem Extrakt die folgenden Komponenten (nach Saier et al.1971):

50 mM KPO_4-Puffer pH 7,4
1 mM DTE
1 mM NaF
5 mM $MgCl_2$
10 mM Fructose
10 mM PEP Testtemperatur = 25°C

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 0,025-1,0 ml. Die Reaktion wurde durch Mischen des Ansatzes oder eines Aliquots mit dem gleichen Volumen Äthanol abgestoppt. Zur Messung der Reaktion wurden drei Methoden angewandt:

a) Es wurde das aus PEP gebildete Pyruvat gemessen. Hierzu wurde das abgestoppte Reaktionsgemisch zentrifugiert und die Pyruvatkonzentration im Überstand bestimmt. Das zum Abstoppen der Reaktion verwendete Äthanol hatte auf die enzymatische Bestimmung des Pyruvats infolge der weiteren Verdünnung keinen Einfluß.

b) Es wurden die aus Fructose gebildeten Reaktionsprodukte bestimmt. Hierzu wurde als Extrakt im Testansatz nur die Pelletfraktion verwendet, um den Einfluß der im Rohextrakt befindlichen löslichen Enzyme weitgehend auszuschalten. Nach Abstoppen der Reaktion wurde im Überstand die Konzentration der Reaktionsprodukte der Fructose in einem modifizierten Ansatz zum Test der Phosphofructokinase gemessen:

0,760 ml	50 mM	TEA-Puffer pH 8
0,100 ml		Überstand
0,010 ml	100 mM	$MgCl_2$
0,050 ml	100 mM	reduziertes Glutathion
0,050 ml	15 mM	ATP
0,020 ml	15 mM	NADH
0,005 ml		GDH/TIM (2mg/ml)
0,005 ml		Aldolase (2mg/ml)
0,005 ml		6-PFK (2mg/ml)
0,001 ml		1-PFK

Der Extinktionsabfall bei sukzessiver Zugabe der Hilfsenzyme ermöglichte die Messung von Triosephosphat, FDP, F-6-P und F-1-P.

c) Es wurden die aus U-^{14}C-Fructose gebildeten phosphorylierten Reaktionsprodukte nach dem Verfahren von Newsholm et al.(1967) gemessen. Der Testansatz enthielt hier zusätzlich ca. 13,7 µCi U-^{14}C-Fructose bei einem Gesamtvolumen von 25 µl. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde ein Aliquot von 20 µl als Fleck ins Zentrum eines DEAE-Cellulose-Filterplättchens (DE 81, Ø 2,3 cm, Fa.Whatman) aufgetragen und 30 min bei Zimmertemperatur getrocknet. Dieses Filter wurde dann über zwei weitere frische Filterplättchen auf eine Absaugvorrichtung gelegt und unter Durchsaugen von 100 ml H_2O gewaschen. Hierbei wurde die U-^{14}C-Fructose herausgewaschen, während die radioaktiven Reaktionsprodukte der Fructose auf Grund ihrer Phosphatgruppe auf dem Ionenaustauscherfilter zurückgehalten wurden. Nach Newsholm et al.(1967) werden Proben von radioaktivem Glucose-6-phosphat oder Glycerophosphat trotz Waschens zu mehr als 97% auf dem Ionenaustauscherfilter zurückgehalten. Proben mit unphosphorylierter radioaktiver Glucose oder Glycerin werden dagegen zu mehr als 97% herausgewaschen. Nach dem Waschen wurden die drei Filterplättchen 15 min bei 90°C getrocknet und gemeinsam in 15 ml Äthanol-Toluol-Scintillationscocktail ausgezählt.

15. Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivitätsbestimmung von Lösungen und Suspensionen erfolgte in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (TriCarb Modell 3375, Fa.Packard). Es wurden folgende Scintillationscocktails verwendet:

a) Toluol-Scintillationscocktail

1000 ml	Toluol
4,0 g	PPO (2,5-Diphenyloxazol)
0,1 g	POPOP (2,2'-p-Phenylen-bis-(4-methyl-5-phenyl-oxazol))

In 10 ml dieses Cocktails wurden die Carotinoidproben ausgezählt.

b) Äthanol-Toluol-Scintillationscocktail

632 ml	Toluol
368 ml	Äthanol absolut
4,0 g	PPO
0,1 g	POPOP

In 15 ml dieses Cocktails wurden auf Membranfilter abgesaugte Bakteriensuspensionen ausgezählt. Die in der Suspension enthaltene geringe Menge Wasser war in dem Cocktail löslich.

c) Aquasol und Unisolve

Aquasol (Fa.New England Nuclear, Dreieichenhain) und Unisolve (Fa.Koch & Light, England) sind fertige Scintillationscocktails auf Xylenol-Basis, die mit Wasser in bestimmten Volumenverhältnissen (maximal 25% H_2O) klare Gemische ergeben. Beide Cocktails wurden routinemäßig für alle Lösungen und Suspensionen verwendet.

Die Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten wurde mit Hilfe eines Dünnschichtplatten-Scanners bestimmt. Der Plattenvorschub betrug 60 mm/Std. Die Durchführung der Messung wurde dankenswerterweise von Herrn K.Fait (Zentrales Isotopenlabor der Universität Göttingen) übernommen.

16. Messung von $^{14}CO_2$

$^{14}CO_2$ wurde in 0,2 ml einer 10% KOH-Lösung absorbiert. Diese Lösung wurde in 9 ml Aquasol + 1 ml H_2O überführt, 5 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann im Scintillationszähler ausgezählt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß bei Verwendung von Aquasol als Scintillationscocktail die Radioaktivitätsausbeute von $^{14}CO_2$, das in KOH-Lösung absorbiert worden war, genauso hoch war, wie bei Verwendung von Hyaminhydroxid-Lösung als Absorptionsmittel. Kürzlich wurde auch von Davis et al.(1975) gezeigt, daß $^{14}CO_2$ in KOH-Lösung ohne Ausbeuteverlust in Scintillationscocktails auf Xylenol-Basis direkt gemessen werden kann. Es war also nicht nötig, das $^{14}CO_2$, das in KOH-Lösung absorbiert worden war, zum Auszählen erst noch in Hyaminhydroxid-Lösung zu überführen, wenn Aquasol als Scintillationscocktail verwendet wurde.

$^{14}CO_2$ in KOH-Lösung ließ sich sowohl in Aquasol als auch in Unisolve auszählen. Alkalische Lösungen erzeugen in beiden Scintillationscocktails einen hohen Chemolumineszens-Background. Dieser war aber bei Verwendung von Aquasol bereits nach 5 Std. auf einen konstanten Wert von ca.60 cpm abgeklungen, während bei Unisolve hierfür ein Zeitraum von 15 Std. nötig war. Deshalb wurde zur Messung von $^{14}CO_2$ in KOH-Lösung Aquasol bevorzugt.

17. Bestimmung der Zählausbeute

Um die bei der Scintillationsmessung erhaltenen cpm-Werte in dpm bzw. Ci umrechnen zu können, muß die Zählausbeute bei der Messung bekannt sein. Um diese bei jeder Messung ermitteln zu können, wurde für jeden der verwendeten Scintillationscocktails eine Quenchkorrektur-Kurve angefertigt. Hierzu wurde eine bestimmte Menge (ca.0,5g) von 1-^{14}C-n-Hexadecan-Standart (1,016 µCi/g) in dem betreffenden Scintillationscocktail gelöst und auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde dann in Portionen von 2,5 ml in Scintillationsröhrchen pipettiert und im Scintillationszähler ausgezählt. Es wurde der Mittelwert der cpm in den einzelnen Röhrchen berechnet; die Röhrchen mit einer Abweichung vom Mittelwert

von mehr als 1% wurden verworfen. Nun wurde in die Röhrchen eine zunehmende Menge (0-200 µl) von CCl_4 als chemischer Quencher pipettiert, mit Scintillationscocktail auf 10 ml aufgefüllt und die cpm und das AES-Verhältnis im Scintillationszähler gemessen. Aus den einzelnen cpm-Werten wurden die jeweiligen Zählausbeuten berechnet und diese gegen die entsprechenden AES-Verhältniswerte aufgetragen (Quenchkorrektur-Kurve). Das AES-Verhältnis als Maß für den Quencheffekt wird in dem verwendeten Scintillationszählermodell bei externer Standardisierung für jede Probe automatisch ausgedruckt und wird durch Messung der Probe auf zwei Kanälen mit und ohne externe γ-Quelle ermittelt.

Zur Quenchkorrektur bei der Messung von ^{14}C-markierten Carotinoiden wurde eine Quenchkorrekturkurve, die mit Rhodopin als Farb-Quencher angefertigt worden war, von Dr.K.Schmidt freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

18. Assimilation von ^{14}C-Hexose

Versuche über die Assimilation von ^{14}C-Hexose wurden in Warburggefäßen unter aeroben oder phototrophen Bedingungen durchgeführt. Die Warburggefäße wurden folgendermaßen beschickt:

Hauptraum:	2 oder 3 ml	Zellsuspension, E_{650}=1,5 , in Mineralnährlösung mit Thiamin
Seitenarm:	20 oder 30 µl	U-^{14}C-Glucose- bzw. Fructose-Lsg. (Endkonzentration 1 mM; 0,1 bzw. 0,3 µCi/µmol)

Die Warburggefäße wurden an Stangen befestigt, die in die Halterungen des Wasserbads einer Rundwarburgapparatur eingesetzt wurden (siehe auch Methoden 6); die Temperatur des Wasserbads wurde bei 25°C konstant gehalten. Für einen aeroben Versuch wurden aerob kultivierte Zellen verwendet. Die Warburggefäße wurden mit Alufolie abgedunkelt und unverschlossen bei 150 Upm im Wasserbad reziprok geschüttelt. Phototrophe Versuche wurden mit anaerob im Licht angezogenen Zellen durchgeführt. Die Warburggefäße wurden mit Serumkappen verschlossen und bei 75 Upm geschüttelt. Um anaerobe Bedingungen zu erzielen, wurden die Gefäße mit Hilfe von Kanülen 10 min mit N_2 durchströmt. Außerdem wurden die Gefäße durch eine Beleuchtungseinrichtung von unten beleuchtet.

Der Versuch wurde durch Einkippen des Inhalts des Seitenarms in den Hauptraum gestartet. Mit einer Hamiltonspritze wurden durch den Serumstopfen hindurch 100 µl-Proben entnommen und auf Membranfilter (Porengröße 0,45 µm, Ø 25 mm, Fa.Sartorius, Göttingen) abgesaugt. Die Filter wurden sofort mit 10 ml eiskalter Nährlösung (1 mM an kalter Glucose bzw. Fructose) gewaschen und in Äthanol-Toluol-Scintillationscocktail ausgezählt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Rate der Fructoseassimilation unter aeroben und phototrophen Bedingungen bis zu einer Trübung von mindestens E_{650}=3 der eingesetzten Zelldichte proportional war. Die Assimilationsversuche wurden auch in Gegenwart von Chloramphenicol durchgeführt. Hierfür wurde der Zellsuspension Chloramphenicol (50 µg/ml) zugesetzt. Die verwendete Konzentration war für eine vollständige Hemmung des Wachstums gerade ausreichend, wie in Wachstumsversuchen vorher festgestellt worden war.

19. Einbau von ^{14}C-Hexose in Pyruvat

Der Versuch zum Einbau von ^{14}C-Hexose in Pyruvat wurde analog zu den Ausscheidungsversuchen (Methoden 6) unter aeroben Bedingungen in Warburggefäßen durchgeführt. Die Warburggefäße enthielten:

Hauptraum:	1 ml	Zellsuspension, E_{650}=6, in 12 mM $NaKPO_4$-Puffer pH 6,9
	5 µmole	Na-Arsenit
Seitenarm:	1 µmol	1-^{14}C- bzw. U-^{14}C-Hexose (3 µCi/µmol)

Die unverschlossenen Warburggefäße wurden mit Hilfe von Stangen ins Wasserbad einer Rundwarburgapparatur eingehängt und 30 min geschüttelt (100 Upm, 30°C). Dann wurde der Inhalt des Seitenarms in den Hauptraum gekippt und 1 Std. unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Gefäße in Zentrifugengläser überführt und die Zellen abzentrifugiert. Die Warburggefäße und das Pellet wurden mit H_2O gewaschen, die Überstände vereinigt und auf 4 ml aufgefüllt.

Die Isolierung des Pyruvats erfolgte mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie nach einer Methode von Thauer et al.(1970). Eine Säule (Ø ca.0,5 cm) wurde mit 1,5 g (Feuchtgewicht) Dowex 2 X 8 Formiat (200-400 mesh, Fa.Fluca) gefüllt. 2 ml des Überstands wurden unter Zusatz von 5 µmole kaltem Pyruvat aufgetragen und mit 2x 0,5 ml H_2O in die Säule eingewaschen. Zur Elution wurden zunächst insgesamt 3 ml H_2O und 16 ml 0,4 N Ameisensäure auf die Säule aufgetragen; die so eluierten Fraktionen enthielten nicht umgesetzte Hexose und eventuell gebildetes Lactat oder Acetat; sie wurden nach dem Auszählen der Radioaktivität verworfen. Dann wurde mit 5x 2 ml 0,8 N H_2SO_4 eluiert. Das radioaktive Pyruvat erschien als scharfer Peak bei 4-7 ml und enthielt 60-70% der auf die Säule aufgetragenen Radioaktivität bei einer Gesamtausbeute von 90-100%. Die Fraktionen des Radioaktivitätspeaks wurden vereinigt und zur Decarboxylierung des Pyruvats eingesetzt.

Die Decarboxylierung des Pyruvats erfolgte nach der Methode von Fromageot und Desnuelle (1935) mit Hilfe von Cer(IV)-sulfat als Katalysator. Die Reaktion wurde in drei Parallelen in zweiarmigen Warburggefäßen, die mit Serumkappen verschlossen waren, durchgeführt. Die Gefäße enthielten:

Hauptraum: 1,0 ml ^{14}C-Pyruvat-Lsg.
1.Seitenarm: 0,1 ml 10 N H_2SO_4
2.Seitenarm: 0,1 ml $Ce(SO_4)_2$-Lsg., gesättigt in 1 N H_2SO_4
Zentralzylinder: 0,2 ml 10% KOH-Lsg. mit Filterpapierstreifen

Die Reaktion wurde durch Kippen des Inhalts beider Seitenarme in den Hauptraum gestartet; die Gefäße wurden dann 3 Std. bei 30°C in einem Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden die Gefäße geöffnet und der Inhalt des Zentralzylinders in Aquasol überführt. Außerdem wurde ein Aliquot aus dem Hauptraum (0,1 ml) und von dem eingesetzten Pyruvat (1 ml) in Aquasol pipettiert und im Scintillationszähler ausgezählt.

Zur Überprüfung der verwendeten Methoden wurden in einem Vorversuch 5 µmole 1-^{14}C-Pyruvat unter denselben Bedingungen auf die oben beschriebene Ionenaustauschersäule aufgetragen und schrittweise eluiert: Das Elutionsvolumen des radioaktiven Pyruvats war

dasselbe. Bei der Decarboxylierung des eluierten 1-^{14}C-Pyruvats wurde bereits nach 15 min Reaktionszeit eine $^{14}CO_2$-Ausbeute von 96% erzielt. Diese Decarboxylierungsausbeute konnte bei 3-stündiger Inkubation nur noch auf 98% gesteigert werden.

20. Präparation von positions-markierter ^{14}C-Fructose:
Aus 2-^{14}C-, 3-^{14}C- und 3,4-^{14}C-Glucose wurde die entsprechend markierte Fructose nach einer Methode von Muntz und Carroll (1960) präpariert. Diese Methode wurde in einer von Avigad et al. (1966) modifizierten Form erprobt und nach weiterer Modifikation in Hinsicht auf die Fructoseausbeute optimiert. Die entgültige Präparationstechnik umfaßte folgende Schritte:

2,2 ml Glucose-Lösung (50 µmole, 10 oder 20 µCi) wurden mit 0,1 ml einer 9% $NaBH_4$-Lösung versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Hierbei wurde die Glucose zu Sorbit reduziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,4 ml 1 N HCl abgestoppt. Es wurden einige Tropfen Bromkresolgrün-Lösung zugegeben und mit etwa 0,5 ml 0,5 N NaOH bis zum Umschlag der Färbung titriert. Diese Lösung wurde in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40°C eingedampft. Um die Borsäure aus dem Rückstand zu entfernen, wurde dieser mit 10 ml Methanol aufgenommen und mit dem Rotationsverdampfer eingedampft. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Schließlich wurde der Rückstand in 2 ml H_2O gelöst und diese Lösung mit einem Ionenaustauschermischbett entsalzt. Das Ionenaustauschermischbett wurde folgendermaßen hergestellt: Dowex 1 X 1 Cl^- (50-100 mesh, Fa.Serva, Heidelberg) wurde abgewogen und mit 0,5 N NaOH in die OH^--Form überführt und mit H_2O alkalifrei gewaschen. Es wurde die gleiche Menge Dowex 50W X 8 H^+ (50-100 mesh, Fa.Serva, Heidelberg) hinzugefügt, gemischt, mit H_2O gewaschen und in eine Glassäule (Ø ca.1 cm) gefüllt. Zum Entsalzen wurde der gelöste Rückstand auf das Mischbett (ca.10 ml) aufgetragen und mit insgesamt 20 ml H_2O eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer eingedampft und in 0,8 ml 200 mM KPO_4-Puffer pH 8 wieder aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden die Komponenten hinzugefügt, die für die enzymatische Umwandlung der Sorbit-Lösung in eine Fructose-Lösung benötigt wurden. Der vollständige Ansatz enthielt:

0,8 ml		Sorbit-Lsg. in 200 mM KPO_4-Puffer pH 8
1,0 ml		H_2O
0,8 ml	10,5 mM	NAD
0,8 ml	250 mM	Na-Pyruvat
0,1 ml		LDH (5mg/ml)
0,5 ml		Sorbit-DH (2mg/ml)

Diese Lösung wurde 90 min bei 37°C inkubiert; die Reaktion wurde durch Entsalzen mit dem oben beschriebenen Ionenaustauschermischbett (ca.20 ml) abgestoppt. Das Eluat wurde bis zu einem kleinen Volumen eingeengt.

Diese Lösung wurde strichförmig auf 6 Dünnschichtplatten (Cellulose G1440, Schichtdicke 0,1 mm, Größe 20x20 cm, Fa.Schleicher & Schüll) aufgetragen; 1 µmol Fructose oder Sorbit pro cm wurde noch gut getrennt. Es wurde dreimal je 3 Std. aufsteigend in n-Butanol/Äthanol/H_2O (52:33:15) entwickelt. Die Fructose- und Sorbit-Banden wurden an ihrer schwachen Fluoreszens im UV-Licht (366 nm) und durch Besprühen eines schmalen Randstreifens mit einem Borat-pH-Indikatorreagenz (Bradfield und Flood 1950) lokalisiert. Die Flecken erschienen gelb auf blauen Hintergrund und bestanden aus einer oberen dicken Fructose-Bande und einer unmittelbar darunter liegenden dünnen Sorbit-Bande. Die Fructose-Bande wurde bis auf einen schmalen unteren Randstreifen ausgekratzt und zur Elution in H_2O suspendiert. Nach einiger Zeit wurde auf eine G3-Fritte dekantiert und abgesaugt. Die Cellulose wurde mehrfach mit H_2O gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden durch ein Membranfilter gesaugt und das Filtrat auf 3-6 ml eingeengt. Diese Lösung wurde nach Bestimmung der spezifischen Radioaktivität (Fructosebestimmung mit dem Resorcin-Thioharnstoff-Reagenz) für die radiorespirometrischen Versuche verwendet. Die spezifische Radioaktivität betrug für 2-^{14}C- und 3-^{14}C-Fructose 0,17 µCi/µmol und für 3,4-^{14}C-Fructose 0,33 µCi/µmol. Dünnschichtchromatogramme mit diesen Fructosepräparaten zeigten keine Sorbit-Bande mehr. Ein Wechsel in der Position der Markierung im Fructosemolekül während des Umwandlungsprozesses von Glucose in Fructose kann ausgeschlossen werden (Muntz und Carroll 1960).

Zur Optimierung der verwendeten Präparationstechnik waren in Vorversuchen folgende Parameter variiert worden: die Menge der $NaBH_4$-Lösung, die Reaktionszeit mit $NaBH_4$ und die Inkubationszeit des enzymatischen Ansatzes. Zur chromatographischen Reinigung der Fructose waren 5 Fließmittelsysteme, präparative Cellulose-Dünnschichtplatten (Schichtdicke 0,5 mm) und absteigende Papierchromatographie erprobt worden. Am Schluß wurde eine maximale Fructoseausbeute von 82% nach der enzymatischen Umwandlung von Sorbit zu Fructose und von 54% nach der chromatographischen Reinigung erzielt.

21. Radiorespirometrische Versuche

Die radiorespirometrischen Versuche wurden unter aeroben Bedingungen in einarmigen Warburggefäßen durchgeführt. Die Zellen wurden aerob angezogen und in der mittleren log-Phase (E_{650}= ca.0,3) geerntet, zweimal gewaschen und in Mineralnährlösung mit Thiamin oder 0,01% Hefeextrakt resuspendiert. Die Warburggefäße enthielten:

Hauptraum: 0,8 ml Zellsuspension, E_{650}=2, in Mineralnährlösung mit Thiamin oder 0,01% Hefeextrakt

Seitenarm: 0,2 ml ^{14}C-Hexose (positions-markiert, 2 µmole, ca.0,08 µCi).

Zentralzylinder: 0,2 ml 10% KOH-Lsg. mit Filterpapierstreifen

Die Gefäße wurden mit Serumkappen verschlossen und mit Hilfe von Stangen in das Wasserbad einer Rundwarburgapparatur eingesetzt. Zunächst wurde zum Temperaturangleich 10-15 min mit offenen Schornsteinen bei 30°C und 100 Upm reziprok geschüttelt. Die Schornsteine wurden dann geschlossen, der Inhalt des Seitenarms in den Hauptraum gekippt und weitergeschüttelt. Zu verschiedenen Zeiten wurde 0,1 ml 4 N HCl mit einer Hamiltonspritze durch den Serumstopfen hindurch in den Hauptraum gespritzt. Hierdurch wurden die Zellen abgetötet und das gebildete CO_2 in die im Zentralzylinder befindliche KOH-Lösung übergetrieben. Es wurde noch 30 min weitergeschüttelt, dann wurden die Warburggefäße geöffnet und der Inhalt des Zentralzylinders in Aquasol überführt. Der Inhalt des Hauptraums wurde quantitativ in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen überführt und mit H_2O auf 3 ml aufgefüllt. Nach

Zentrifugation wurde 1 ml des Überstehenden in Aquasol pipettiert und das Pellet mit Hilfe von insgesamt 1 ml H_2O ebenfalls in Aquasol überführt. Außerdem wurde ein Aliquot der eingesetzten ^{14}C-Hexose (0,2 ml) ausgezählt.

In Vorversuchen mit Rps.capsulata wurde festgestellt, daß die Rate der $^{14}CO_2$-Bildung aus U-^{14}C-Glucose und -Fructose proportional zur Zelldichte bis zu einer Trübung von mindestens E_{650}= 4 war. Bei dieser Trübung und einer Reaktionszeit von 10 min wurde die maximale Rate bereits erreicht, wenn 1 µmol Glucose oder Fructose in den Seitenarm pipettiert worden war.

In den Hauptversuchen wurde 1-^{14}C-, 2-^{14}C-, 3-^{14}C-, 3,4-^{14}C-, 6-^{14}C- und U-^{14}C-Hexose eingesetzt. Die $^{14}CO_2$-Ausbeute von 4-^{14}C-Hexose wurde mit Hilfe der Ausbeuten aus 3-^{14}C- und 3,4-^{14}C-Hexose berechnet: (4-^{14}C) = 2 x (3,4-^{14}C) - (3-^{14}C).

22. Einbau von ^{14}C-Hexose in die Carotinoidfraktion

Rhodopseudomonas capsulata und Rps.sphaeroides wurden anaerob im Licht bei 500 Lux in Schraubdeckelflaschen (50 ml) kultiviert. Die Mineralnährlösung enthielt Thiamin bzw. 0,01% Hefeextrakt, außerdem 5 mM $NaHCO_3$ und 5 mM Hexose, die in 1-, 3- oder 6-Stellung ^{14}C-markiert war (ca.0,5 µCi/Kultur). Nach zwei bis drei Tagen waren die Kulturen ausgewachsen und wurden geerntet. Die Radioaktivität wurde in einem Aliquot der Zellen, des überstehenden Mediums und der eingesetzten Hexose gemessen. Die Zellen enthielten je nach Position der Markierung der Hexose 50-83% der eingesetzten Radioaktivität bei einer Gesamtausbeute von 84-97%. Die Zellen wurden einmal mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur Extraktion eingefroren (-30°C) aufbewahrt.

Zur Isolierung der Carotinoide (Schmidt 1971, Liaaen-Jensen 1962) wurde das Zellsediment mit Aceton/Methanol (1:1) extrahiert. Bei diesem und den folgenden Arbeitsgängen wurde möglichst immer im Dunkeln und unter einer N_2-Atmosphäre gearbeitet. Der Pigmentextrakt wurde in einen Scheidetrichter überführt, der etwa 150 ml

3% NaCl-Lösung und etwa 50 ml Diäthyläther enthielt. Durch Schütteln des Gemischs wurden die lipophilen Pigmente in die Ätherfraktion überführt, während die hydrophilen Bestandteile in der wässrigen Phase zurückblieben. Die wässrige Phase wurde abgelassen, die Ätherphase in einen Spitzkolben dekantiert und der Scheidetrichter mehrmals mit kleinen Ätherportionen nachgewaschen. Durch Evakuieren des Spitzkolbens mit einer Wasserstrahlpumpe und anschließend mit einer Motorsaugpumpe bei 40°C wurde der Äther abgedampft und der Pigmentrückstand getrocknet. Dieser Rückstand wurde in 5 ml Äther aufgenommen und zur Verseifung des Bakteriochlorophylls mit demselben Volumen 10% KOH-Lösung in Methanol versetzt und eine Stunde stehen gelassen. Die Lösung wurde anschließend in einen Scheidetrichter mit NaCl-Lösung und Äther gefüllt. Die Ätherphase wurde wie oben isoliert, eingedampft, getrocknet und der Rückstand wieder in Äther aufgenommen. Diese Fraktion enthielt nur noch nicht verseifbare, lipophile Verbindungen und war durch das Spheroidene intensiv orange-braun gefärbt. Die spezifische Radioaktivität dieser Carotinoidfraktion wurde aus ihrer Radioaktivität und dem Spheroidenegehalt berechnet. Die Spheroidenekonzentration wurde mit Hilfe eines Spektrums (350-500 nm) bestimmt. Der Kalkulation wurde der Extinktionskoeffizient des Hauptpeaks bei 452 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 2600) zugrunde gelegt (Eimhjellen und Liaaen-Jensen 1964). Die Radioaktivität der Fraktion wurde gemessen, indem ein Aliquot in ein Scintillationsröhrchen pipettiert und unter einem N_2-Strom eingetrocknet wurde. Der Rückstand wurde in Toluol-Scintillationscocktail gelöst und ausgezählt. Außerdem wurde ein Aliquot auf eine Silicagel-Dünnschichtplatte (Schichtdicke 0,1 mm, Fa.Merck) aufgetragen und in Petroläther mit 10% Aceton entwickelt. Die gefärbten Carotinoidflecken wurden sofort markiert. Anschließend wurde die Verteilung der Radioaktivität auf der Platte mit Hilfe eines Dünnschichtplatten-Scanners ermittelt.

23. Material

Es wurden p.A.-Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Die folgenden Chemikalien stammen von anderen Firmen:
Chloramphenicol und MNG, Fa.Serva, Heidelberg
Penicillin G-Natrium, Fa.Dauelsberg, Göttingen
Dithioerythritol, Fa.Sigma, USA
Resorcin und $Ce(SO_4)_2$, Fa.British Drug Houses, England
Na-Arsenit, Fa.Riedel de Haen, Hannover

Es wurden von der Fa.Merck folgende Zucker verwendet: Glucose für biochenische Zwecke, Fructose kristallin und Saccharose reinst.

Biochemikalien und Enzyme wurden von der Fa.Boehringer, Mannheim, bezogen. KDPG wurde von Frau Berndt, KDG von Dr.R.Bender und 1-PFK aus Clostridium pasteurianum von Dr.H.von Hugo zur Verfügung gestellt. KDPG-Aldolase wurde aus Alcaligenes eutrophus H16 nach den Angaben von Robra (1971) angereichert.

Die Radiochemikalien wurden von der Fa.Amersham-Buchler, Braunschweig, geliefert. 3-^{14}C- und 3,4-^{14}C-Glucose waren von der Fa.New England Nuclear, Dreieichenhain, 6-^{14}C-Fructose stammte von der Fa.Mallinckrodt, USA.

N_2-Gas wurde in 2-Ring-Qualität von der Fa.Messer, Griesheim, bezogen.

ERGEBNISSE

1. Der Abbau von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas capsulata

Rhodopseudomonas capsulata bietet sich für eine vertiefte Untersuchung der Zuckerabbauwege aus verschiedenen Gründen an: Das Bakterium wächst sowohl aerob im Dunkeln als auch anaerob im Licht. Es vermag mit Glucose, Fructose und Saccharose als einziger H- und C-Quelle zu wachsen. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist mit einer Verdopplungszeit von etwa 3 Std. sehr schnell verglichen mit den üblichen Wachstumsraten phototropher Bakterien. Rps.capsulata ist nicht auf die Supplementierung der Nährlösung mit Hefeextrakt angewiesen; das Bakterium nimmt mit einem geringen Thiaminzusatz vorlieb. Auf Grund radiorespirometrischer Experimente ist bereits bekannt, daß Glucose über den ED-Weg abgebaut wird (Eidels und Preiss 1970), während der Abbauweg der Fructose noch nicht untersucht worden ist.

1.1. Enzyme der Hexoseabbauwege

Eidels und Preiss (1970) prüften die Enzyme des Hexosestoffwechsels in Glucose und Malat gewachsenen Zellen. Sie fanden, daß Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) und 6-Phosphogluconat(6PG)-Dehydratase mit Glucose induziert werden. 6-Phosphofructokinase (6-PFK) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PG-DH), die Schlüsselenzyme des EM-Weges bzw. des PP-Weges, waren nur in äußerst geringer spezifischer Aktivität nachweisbar. Auf Grund dieser enzymatischen und ihrer radiorespirometrischen Ergebnisse schlossen die Autoren, daß Glucose ausschließlich über den ED-Weg abgebaut wird.

Tabelle 1 zeigt die spezifischen Aktivitäten wichtiger Enzyme des Hexoseabbaus in Rps.capsulata nach Wachstum mit Malat, Glucose und Fructose. Die 1-Phosphofructokinase (1-PFK), das zur 6-PFK alternative Schlüsselenzym des EM-Weges, wurde bei Wachstum mit Fructose mindestens 20-fach induziert. Ebenso lag die Fructose-1,6-diphosphatase (FDPase) in höherer spezifischer

Tabelle 1: Enzyme des Zuckerstoffwechsels von Rps.capsulata nach Anzucht auf Malat, Glucose und Fructose

Enzym	Spez. Aktivität (mE/mg) nach Wachstum[1] anaerob im Licht (aerob im Dunkeln) auf		
	Malat	Glucose	Fructose
Glucokinase	107	101	117
Fructokinase	7	7	8
Phosphoglucose-isomerase	322	542	474
Phosphofructo-mutase			n.n.[2] (n.n.)
G-6-P-DH NADP	27	88 (96)[3]	46 (51)
6PG-DH NADP	n.n.	n.n.	n.n.
NAD	n.n.	n.n.	n.n.
6PG-Dehydratase + KDPG-Aldolase	19	148 (149)	77 (89)
1-PFK	2	2 (3)	39 (98)
6-PFK	3	4 (7)	6 (9)
FDP-Aldolase	140	67	163
FDPase	22	8	43

1) Die Mineralnährlösung enthielt 0,05% Hefeextrakt.

2) n.n. = nicht nachweisbar

3) Die Klammern enthalten die Werte nach Anzucht aerob im Dunkeln.

Aktivität vor als in Glucosezellen, was mit der Rolle dieses Enzyms bei der Hexose-6-phosphat-Bildung erklärt werden kann. G-6-P-DH, 6PG-Dehydratase und KDPG-Aldolase besaßen in Glucose- und Fructosezellen höhere spezifische Aktivitäten als in Malatzellen. Das Niveau war dabei in Glucosezellen etwa doppelt so hoch wie in Fructosezellen, während das der Fructose-1,6-diphosphat(FDP)-Aldolase niedriger war. Eine 6PG-DH war nicht nachweisbar, wodurch die Beteiligung des PP-Weges am Zuckerabbau ausgeschlossen wurde.

1-PFK war ausschließlich in Fructosezellen vorhanden. Glucosezellen besaßen das Enzym nicht, induzierten es aber bei Inkubation mit Fructose unter phototrophen oder aeroben Wachstumsbedingungen (Tabelle 2). Die Induktion wurde durch Chloramphenicol verhindert.

Tabelle 2: Induktion der 1-Phosphofructokinase durch Fructose

Wachstumsbedingungen vor Induktion	Spez. Aktivität (mE/mg) der 1-PFK		
	ohne Induktion	nach 8 Std. Inkubation mit 20 mM Fructose unter	
		Wachstumsbedingugen	Wachstumsbedingungen + Chloramphenicol
anaerob-Licht	2	25	2
aerob-dunkel	3	33	4

Rps.capsulata wurde mit Glucose angezogen, in der späten log-Phase geerntet, gewaschen und in Mineralnährlösung mit Thiamin und 20 mM Fructose resuspendiert. Die Suspensionen wurden ohne und mit Chloramphenicol (200 µg/ml) 8 Std. anaerob im Licht oder aerob im Dunkeln inkubiert.

Die Induktion der 1-PFK läßt vermuten, daß Fructose im Gegensatz zu Glucose über den EM-Weg abgebaut wird. Gleichzeitig besaßen Fructosezellen aber die vollständige Enzymgarnitur des ED-Weges. Damit Fructose in den ED-Weg eingeschleust werden könnte, müßte aus Fructose F-6-P gebildet werden, das mit Hilfe der konstitutiven Phosphoglucoseisomerase (PGI) zu G-6-P umgewandelt werden würde. Im Gegensatz zur Glucokinaseaktivität war die Fructokinaseaktivität aber nur sehr gering, so daß eine direkte Phosphorylierung der Fructose in 6-Stellung in nur geringem Ausmaß erfolgen dürfte. Eine direkte Umwandlung von F-1-P zu F-6-P erscheint nicht möglich, da das für diese Reaktion nötige Enzym, die bis-

lang hypothetische Phosphofructomutase, nicht nachweisbar war. Es besteht aber die Möglichkeit, daß F-6-P mit Hilfe der FDPase über FDP aus F-1-P gebildet wird. Ein Abbau der Fructose über den ED-Weg konnte demnach nicht vollständig ausgeschlossen werden.

1.2. Nachweis eines PEP-Fructose-Phosphotransferasesystems

Die Frage, wie in Rps.capsulata Fructose zu F-1-P umgewandelt wird, ist noch ungeklärt. Saier et al.(1971) fanden, daß Rsp.rubrum und Rps.sphaeroides ein PEP-Fructose-Phosphotransferasesystem(PTS) besitzen, das Fructose in 1-Stellung phosphoryliert. Die folgenden Versuche zeigen, daß Rps.capsulata ebenfalls ein solches PTS enthält.

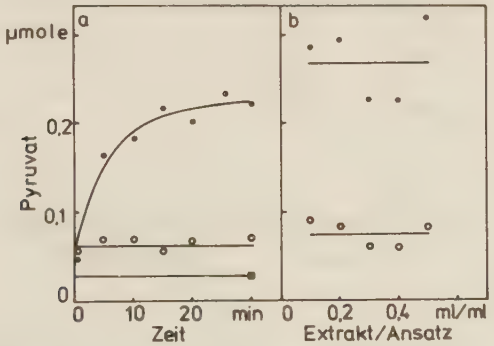


Abb.1: Die Bildung von Pyruvat aus PEP durch das PEP-Fructose-PTS von Rps.capsulata

Die Messung der Reaktion des PTS erfolgte mit dem Test a (Methoden 14) im Rohextrakt von phototroph mit Fructose gewachsenen Zellen. Der Proteingehalt des Extrakts betrug ca.35 mg/ml. 1 ml Testansatz enthielt: 50 µmole KPO_4-Puffer pH 7,4 , 1 µmol DTE, 1 µmol NaF, 5 µmole $MgCl_2$, 10 µmole Fructose und 10 µmole PEP.

a) Pyruvatbildung mit der Zeit: 1 ml Ansatz enthielt 0,4 ml Extrakt.

b) Pyruvatbildung in Abhängigkeit von der Extraktmenge: Reaktionszeit 10 min

●—● PEP + Fructose o—o PEP allein ■—■ ohne Extrakt

Abb.1 zeigt, daß der Rohextrakt auf Fructose gewachsener Zellen eine Aktivität enthielt, die in Gegenwart von Fructose PEP zu Pyruvat umwandelte. Diese Aktivität war aber weder mit der Zeit linear noch der eingesetzten Extraktmenge proportional. Dafür waren möglicherweise Folgereaktionen des Pyruvats in dem ungereinigten Rohextrakt (eine beschallte Zellsuspension) die Ursache.

Mit dem Kinasetest nach Newsholm et al.(1967) wurde eine zeitlineare und extraktproportionale Reaktion erzielt (Abb.2). In diesem Test wurde die Bildung von ^{14}C-Zucker-phosphaten aus ^{14}C-Fructose und PEP gemessen.

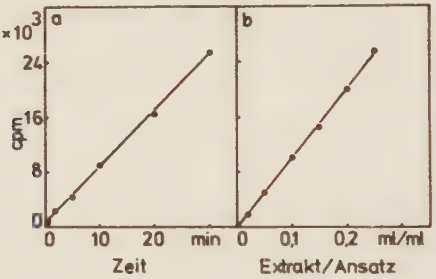


Abb.2: Die Reaktion des PEP-Fructose-PTS von Rps.capsulata in Abhängigkeit von der Zeit (a) und von der eingesetzten Extraktmenge (b)

Die Bestimmung des PEP-Fructose-PTS erfolgte mit dem Test c (Methoden 14) im Rohextrakt von phototroph mit Fructose gewachsenen Zellen. Testansatz: siehe Abb.1, 1 ml Ansatz enthielt zusätzlich 13,7 µCi U-^{14}C-Fructose.

a) 1 ml Ansatz enthielt 0,25 ml Extrakt.
b) Reaktionszeit 30 min

In Rsp.rubrum ist die Aktivität des PEP-Fructose-PTS in der Membranfraktion lokalisiert (Saier et al.1971). Tabelle 3 zeigt, daß in Rps.capsulata nach Fraktionierung 98% der PTS-Aktivität

mit PEP als Phosphatdonor in der Pelletfraktion zu finden war. Mit ATP war die Phosphorylierungsrate der Fructose wesentlich geringer (Abb.3, Tabelle 4). Diese Aktivität war hauptsächlich in der löslichen Fraktion lokalisiert (Tabelle 3 u.4) und entsprach der Größenordnung nach der Fructokinaseaktivität (Tabelle 1).

Tabelle 3: Fraktionierung der Aktivität des PEP-Fructose-PTS von Rps.capsulata

Phosphatdonor für das PEP-Fructose-PTS	Verlust an Aktivität bzw. Protein durch die Fraktionierung des Rohextrakts (%)	Prozentuale Verteilung der Aktivität des PEP-Fructose-PTS bzw. des Proteins auf	
		Pelletfraktion	lösliche Fraktion
PEP	47	98	2
ATP	24	41	59
kein exogener	63	81	19
Protein	15	85	15

Der Rohextrakt von phototroph mit Fructose gewachsenen Zellen wurde durch Zentrifugation (2 Std., 200 000 x g) in eine Pelletfraktion und eine lösliche Fraktion aufgetrennt (Methoden 10). Die Aktivität des Fructose-PTS wurde mit verschiedenen Phosphatdonoren und mit Fructose als Akzeptor im Rohextrakt und den beiden Fraktionen mit dem radiometrischen Test c (Methoden 14) gemessen. Testansatz: siehe Abb.1 u.2, Reaktionszeit 30 min.

Tabelle 4: Spezifische Aktivität des PEP-Fructose-PTS von Rps.capsulata in Abhängigkeit vom Phosphatdonor

Phosphatdonor	Spez. Aktivität (mE/mg) des PEP-Fructose-PTS		
	Rohextrakt	Pelletfraktion	lösliche Fraktion
PEP	4,4	2,6	0,2
ATP	1,7	0,6	4,6
kein exogener	1,1	0,4	0,5

siehe Tabelle 3

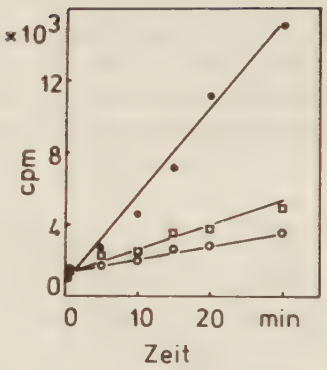
Abb.3: Die Reaktion des PEP-Fructose-PTS in Abhängigkeit vom Phosphatdonor

siehe Abb.2
Die Bestimmung erfolgte in der Pelletfraktion nach Fraktionierung des Rohextrakts (siehe Tabelle 3).
1 ml Ansatz enthielt 11 mg Protein.

●——● Fructose + PEP

□——□ Fructose + ATP

o——o Fructose allein



In Abwesenheit eines Phosphatdonors konnte nur eine geringe Fructosephosphorylierungsrate gemessen werden (Abb.3, Tabelle 4), die hauptsächlich in der Pelletfraktion zu finden war (Tabelle 3). Möglicherweise fand hier eine geringe Reaktion mit enzymgebundenem Phosphat statt. Hierfür spricht auch, daß bei dieser Reaktion ein sehr hoher Aktivitätsverlust (63%) auftrat, wenn der Rohextrakt in Pelletfraktion und lösliche Fraktion aufgetrennt wurde (Tabelle 3). Auch mit PEP als Phosphatdonor ging dabei viel Aktivität verloren, während der Verlust mit ATP in der Größenordnung des Proteinverlusts lag. Bei Rsp.rubrum konnten Saier et al.(1971) durch Waschen der Membranfraktion mit Wasser einen Faktor mit einem Molekulargewicht von 200 000 Daltons entfernen, der für die PEP-Fructose-PTS-Aktivität nötig war. Bei Rps.sphaeroides wurde dieser Faktor bereits mit KCl-Lösung aus der Membranfraktion herausgewaschen. Möglicherweise enthält auch das PEP-Fructose-PTS von Rps.capsulata einen ähnlichen Faktor, der für die PTS-Aktivität der Membranfraktion notwendig ist.

In Rsp.rubrum wird Fructose durch das PEP-Fructose-PTS in 1-Stellung phosphoryliert (Saier et al.1971). Auch die Pelletfraktion von Rps.capsulata bildete F-1-P aus Fructose und PEP (Abb.4). F-6-P wurde nicht gebildet. Um das Auftreten von Triose-phosphat zu erklären, muß angenommen werden, daß die Pelletfraktion mit

etwas 1-PFK, FDP-Aldolase und ATP verunreinigt war. Diese Verunreinigungen könnten die Aktivität des PTS in Abwesenheit eines Phosphatdonors bzw. mit ATP als Phosphatdonor ebenfalls erklären.

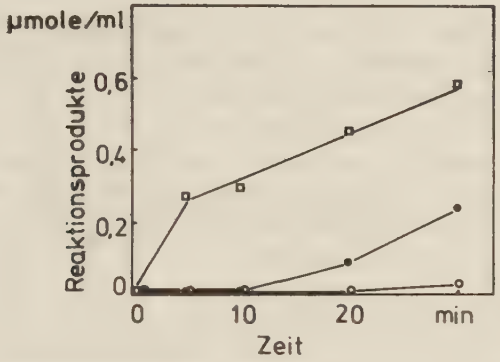


Abb.4: Die Reaktionsprodukte der Fructose nach Phosphorylierung durch das PEP-Fructose-PTS

Die Bestimmung erfolgte in der Pelletfraktion nach Fraktionierung des Rohextrakts (siehe Tabelle 3). Testansatz: siehe Abb.1, 1 ml Ansatz enthielt ca.3 mg Protein. Die Reaktionsprodukte wurden mit Test b (Methoden 14) gemessen.

□——□ F-1-P ●——● Triose-phosphat o——o F-6-P

Tabelle 5: Spezifische Aktivität des PEP-Fructose-PTS von Rps.capsulata nach Anzucht auf Malat, Glucose und Fructose

Wachstumssubstrat	Spez. Aktivität (mE/mg) nach Wachstum anaerob im Licht	aerob im Dunkeln
Malat	0,7	0,1
Glucose	0,7	0,7
Fructose	5,2	5,5

Die Bestimmung erfolgte im Rohextrakt mit dem radiometrischen Test c (Methoden 14) mit PEP als Phosphatdonor.
siehe Tabelle 3

Das PEP-Fructose-PTS war sowohl nach phototrophem als auch aerobem Wachstum mit Fructose vorhanden (Tabelle 5). Malat- und Glucosezellen hatten dagegen nur eine geringe Aktivität. Das PTS wurde also erst durch Fructose induziert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Rps.capsulata ein induzierbares PEP-Fructose-PTS besitzt, das Fructose in 1-Stellung phosphoryliert und in der Pelletfraktion lokalisiert ist. Es wird allgemein angenommen, daß die PEP-Phosphotransferasesysteme die Funktion des Transports von Zuckern in die Zelle ausüben (Kaback 1970, Kornberg und Reeves 1972). Daß Fructosephosphorylierung und Transport gekoppelt sind, wurde für Aerobacter aerogenes nachgewiesen (Kelker und Anderson 1972). Es darf angenommen werden, daß auch in Rps.capsulata Fructose mit Hilfe des PEP-Fructose-PTS gleichzeitig transportiert und phosphoryliert wird. Das Vorhandensein eines zweiten Fructosetransportsystems ähnlich wie in Arthrobacter pyridinolis (Wolfson et al.1974) konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

1.3. Assimilation von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas capsulata

Glucosezellen enthalten sämtliche Enzyme des ED-Weges (Eidels und Preiss 1970, Tabelle 1). Sollte Fructose also über ein konstitutiv vorhandenes oder durch Glucose induzierbares Carriersystem in die Zelle gelangen können und durch die in geringer Aktivität nachgewiesene Fructokinase (Tabelle 1 u.4) phosphoryliert werden, so sollten Glucosezellen auch Fructose assimilieren können. Abb.5 zeigt, daß eine solche Assimilation nur mit einer lag-Phase erfolgt ist. In dieser Zeit konnte aber eine Induktion der Enzyme des Fructoseabbaus (PEP-Fructose-PTS und 1-PFK) stattgefunden haben, da Malatzellen, die weder den EM- noch den ED-Weg induziert hatten, die gleiche lag-Phase zeigten. In Gegenwart von Chloramphenicol wurde Fructose nur in äußerst geringem Maße von Glucosezellen assimiliert (Abb.25).

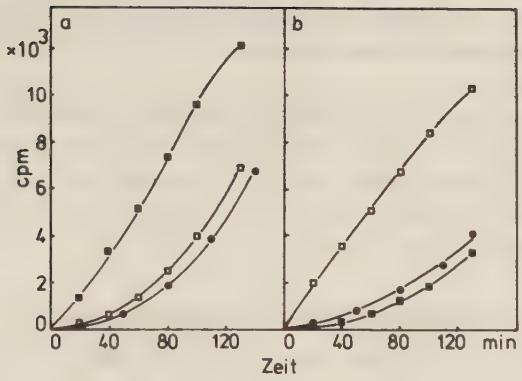


Abb.5: Assimilation von Fructose und Glucose durch Fructose-, Glucose- und Malatzellen von Rps.capsulata unter phototrophen Wachstumsbedingungen

Der Versuch wurde anaerob im Licht durchgeführt (Methoden 18). Die Zellen waren auf Malat, Glucose oder Fructose phototroph angezogen worden. Der Ansatz enthielt: 3 ml Zellsuspension, E_{650}=1,5 , in Mineralnährlösung mit Thiamin, 3 µmole U-^{14}C-Glucose bzw.-Fructose (0,1 µCi/µmol). Es wurden Proben (100 µl) entnommen, auf Membranfilter abgesaugt und gewaschen. Die Membranfilter wurden im Scintillationszähler ausgezählt.

a) Assimilation von U-^{14}C-Fructose
b) Assimilation von U-^{14}C-Glucose

■——■ Fructosezellen (Proteingehalt 0,309 mg/ml)
□——□ Glucosezellen (" 0,333 mg/ml)
●——● Malatzellen (" 0,351 mg/ml)

Weiterhin konnte auch Glucose nicht ohne Induktionsphase von Fructosezellen assimiliert werden (Abb.5 u.26), obwohl Fructosezellen alle notwendigen Enzyme für den Glucoseabbau über den ED-Weg besitzen. Das bedeutet, daß das Transportsystem für Glucose erst hat induziert werden müssen. Da Rps.capsulata über eine konstitutive Glucokinaseaktivität verfügt (Tabelle 1), ist es möglich, daß Glucose unphosphoryliert in die Zelle transportiert wird, wie es z.B. für Pseudomonas aeruginosa bekannt ist (Phibbs

und Eagon 1970). Das Vorhandensein eines PEP-Glucose-PTS, das ja weit verbreitet bei Bakterien ist (Romano et al.1970), konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Versuche zeigten also, daß Glucose- bzw. Fructosezellen die jeweils andere Hexose nicht ohne Induktionsphase verwerten können. Zur Fructoseverwertung ist also anscheinend die Bildung des PEP-Fructose-PTS und der 1-PFK, zur Glucoseverwertung die Bildung eines Transportsystems nötig.

1.4. Glucose$^-$-Mutanten von Rhodopseudomonas capsulata

Aus den bisher vorliegenden Versuchen geht hervor, daß Rps.capsulata in Gegenwart von Fructose das Enzymsystem des EM-Weges induziert. Dieser Nachweis war eine notwendige Voraussetzung für die Annahme, daß Fructose über einen anderen Weg abgebaut wird als Glucose. Als hinreichender Beweis für das Vorliegen des EM-Weges sind die oben geschilderten Versuche jedoch noch nicht anzusehen.

Mutanten werden vielfach benutzt, um Stoffwechselwege in Bakterien aufzuklären (Fraenkel und Vinopal 1973). Mutanten, die im ED-Weg defekt sind und noch mit Fructose, aber nicht mehr mit Glucose zu wachsen vermögen, sollten geeignet sein, die Rolle des EM-Weges beim Fructoseabbau zu klären. Die Existenz solcher Mutanten würde beweisen, daß Fructose ohne Beteiligung des ED-Weges über den EM-Weg abgebaut werden kann.

Nach Mutationsauslösung mit MNG und Anreicherung nach der Penicillintechnik konnten mit Hilfe der Pinpoint-Methode vier unabhängige Mutanten isoliert werden, die mit Glucose sowohl phototroph wie auch aerob nicht wachsen konnten, während das Wachstum mit Fructose normal war.

Die enzymatische Untersuchung der Mutanten ergab, daß sie über keine G-6-P-DH-Aktivität und über nur geringe Aktivität der 6PG-Dehydratase verfügten. In Tabelle 6 sind die Enzymaktivitäten einer repräsentativen Glucose$^-$-Mutante (GP33) im Vergleich zum

Tabelle 6: Enzyme des Zuckerstoffwechsels des Wildtyps und der Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps.capsulata nach Anzucht auf Fructose und Glucose

Enzym	Spez. Aktivität (mE/mg) in Wildtyp und Mutante nach Wachstum auf					
	Wildtyp			GP33		
	Fructose[1] anaerob-Licht	Fructose[1] aerob	Glucose[2] anaerob-Licht	Fructose[1] anaerob-Licht	Fructose[1] aerob	Glucose[2] anaerob-Licht
Glucokinase	117[3]			146		128
Fructokinase	8[3]			15		14
G-6-P-DH NADP	48	115	52	n.n.[4]	n.n.	n.n.
6PG-Dehydratase	96	161	101	6	14	5
KDPG-Aldolase	103	164	110	81	52	82
1-PFK	45	71	1	65	86	3
6-PFK	6			1		2
FDP-Aldolase	90	73	73	127	78	94
FDPase	39	37	25	72	30	16

1) Die Mineralnährlösung enthielt Thiamin (0,1 mg/l).

2) Um der Mutante Wachstum zu ermöglichen, enthielt das Mineralmedium 0,1% Pepton + 0,1% Hefeextrakt.

3) Die Mineralnährlösung enthielt 0,05% Hefeextrakt.

4) n.n. = nicht nachweisbar

Wildtyp dargestellt. Die Mutante besaß unter keiner der gewählten Anzuchtsbedingungen eine meßbare G-6-P-DH-Aktivität. Das Enzym wurde weder in Gegenwart von Glucose gebildet, noch war es in Fructosezellen vorhanden; damit kann ausgeschlossen werden, daß der Mangel an Aktivität auf fehlende Induktion des Enzyms beruht und der eigentliche Mutationsdefekt im Glucosetransportsystem zu suchen ist.

Die niedrige spezifische Aktivität der 6PG-Dehydratase in der Mutante (Tabelle 6) muß nicht unbedingt die direkte Folge einer Mutation sein, sondern kann durch das Fehlen des Induktors verursacht worden sein. Als Induktor wäre in diesem Fall 6PG anzunehmen. Die Aktivität der KDPG-Aldolase war dagegen in der Mutante nur etwas niedriger als im Wildtyp. KDPG oder 6PG konnten also nicht die Induktoren der KDPG-Aldolase sein. Das Vorhandensein dieses Enzyms bei Abwesenheit von 6PG-Dehydratase ist auch bei Thiobacillus novellus (Matin und Rittenberg 1971) und Rps.sphaeroides (Szymona und Doudoroff 1960, siehe auch Kapitel 2.3) bekannt. Für Pseudomonaden konnte gezeigt werden, daß die KDPG-Aldolase und andere Enzyme des ED-Weges auch mit Glycerat oder Glycerin induziert werden können (Quay et al.1972, Hylemon und Phibbs 1972).

1-PFK wurde in Wildtyp und Mutante GP33 nur in Gegenwart von Fructose induziert (Tabelle 6). Auch die anderen Enzyme, die für den Abbau von Fructose über den EM-Weg benötigt werden, wie FDP-Aldolase und FDPase, wurden durch die Mutation nicht beeinflußt.

Abb.6 zeigt das phototrophe Wachstum von Mutante GP33 und Wildtyp mit Glucose, Fructose und Saccharose. Die Trübungszunahme mit Fructose erfolgte bei Mutante und Wildtyp mit etwa der gleichen Verdopplungszeit von 3-4 Std. Mit Glucose und Saccharose wuchs dagegen nur der Wildtyp; übrigens wurden auch Maltose und Cellobiose nur vom Wildtyp verwertet. Das Fehlen der G-6-P-DH verhinderte also das Wachstum mit Glucose, aber nicht mit Fructose. Der Saccharosestoffwechsel wird später (Kapitel 3) behandelt.

Die Mutantenversuche lieferten den Beweis, daß Wachstum auf Fructose auch bei Funktionsunfähigkeit des ED-Weges möglich ist, und zwar mit einer ähnlichen Wachstumsrate wie im Wildtyp. Der Besitz des EM-Weges allein genügt also bereits, um auf Fructose wachsen zu können. Aus diesen an der Mutante gewonnenen Ergebnissen läßt sich jedoch noch nicht schließen, ob Fructose im Wild-

typ ausschließlich über den EM-Weg abgebaut wird oder nicht doch der ED-Weg am Abbau beteiligt ist.

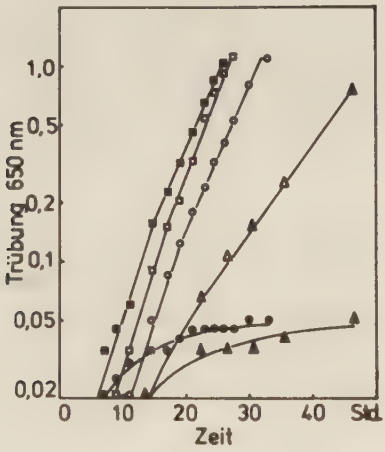


Abb.6: Phototrophes Wachstum des Wildtyps und der Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps.capsulata mit Fructose, Glucose und Saccharose

Schraubdeckelröhrchen (20 ml) waren mit Mineralnährlösung(+ Thiamin) und den angegebenen Substraten (5 mM) vollgefüllt. Die Kulturen wurden mit Malatzellen beimpft und bei 1000 Lux bebrütet. Der Trübungszuwachs wurde im Bausch & Lomb-Photometer verfolgt.

offene Symbole = Wildtyp , geschlossene Symbole = GP33

□—□ ■—■ Fructose ○—○ ●—● Glucose △—△ ▲—▲ Saccharose

1.5. Einbau von ^{14}C-Glucose und -Fructose in das Ausscheidungsprodukt Pyruvat und Lokalisierung der Radioaktivität im Molekül

Der Einbau von positions-markierter ^{14}C-Hexose in Ausscheidungsprodukte wie Pyruvat und Lactat (Dawes und Holmes 1958, Katz und Wood 1960) oder in das Speicherprodukt PHB (Schlegel und Gottschalk 1965) wurde benutzt, um die Abbauwege von Hexosen aufzuklären. Bei Unterscheidung zwischen EM- und ED-Weg ergibt sich folgendes Schema (Abb.7):

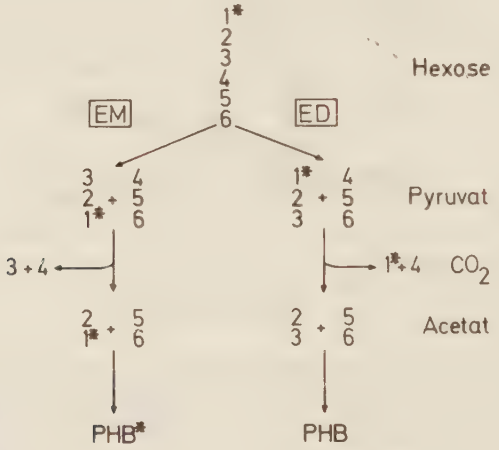


Abb.7: Schema des Einbaus von ^{14}C in CO_2, PHB und Ausscheidungsprodukte beim Abbau von positionsmarkierter Hexose über den EM- bzw. ED-Weg

Wird 1-^{14}C-Hexose über den EM-Weg abgebaut, so wird das markierte C-Atom in die Methylgruppe von Pyruvat, Lactat und Acetat und schließlich in PHB eingebaut. Erfolgt der Abbau über den ED-Weg, so ist die Radioaktivität in der Carboxylgruppe von Pyruvat bzw. Lactat und im CO_2 zu finden. Bei einem Abbau über den PP-Weg würde schließlich nur das CO_2 markiert werden. Diese Überlegung liegt auch dem Verfahren zugrunde, nach dem bei gleichzeitigem Abbau über EM- + PP-Weg der Anteil des PP-Weges bestimmt wird

(Dawes und Holmes 1958, Wood et al.1963). Für die Berechnung der Anteile müssen jedoch eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein, die sich nur zum Teil experimentell nachprüfen und korrigieren lassen ("Non-triosephosphate-pathways", unvollständige Gleichgewichtseinstellung durch die Isomerasen, Rezyklisierung). Dennoch sollte es mit Hilfe des Einbaus von ^{14}C-Hexose möglich sein, entsprechend der Markierung von Speicher- bzw. Ausscheidungsprodukten festzustellen, ob Fructose tatsächlich in erster Linie über den EM-Weg abgebaut wird.

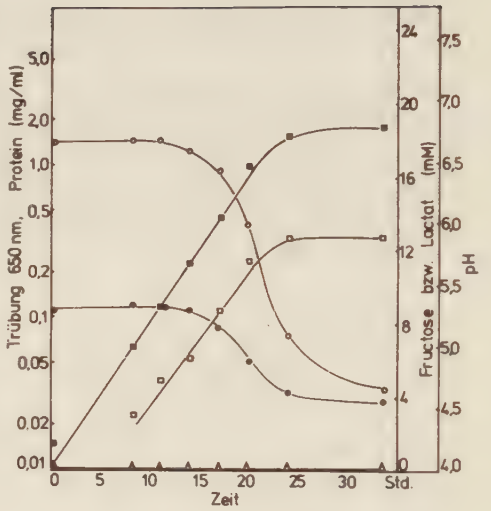
a) Vorversuche:
Phototrophe Bakterien sind befähigt, sowohl Polysaccharide als auch PHB zu speichern (Stanier et al.1959). Vorversuche mit phototrophen und aeroben Zellen von Rps.capsulata zeigten aber, daß sowohl unter Wachstums- als auch N-Mangelbedingungen mit Glucose und Fructose als Substrat keine nennenswerten PHB-Mengen angehäuft wurden.

Regelmäßig konnte festgestellt werden, daß das Medium bei langanhaltendem Wachstum mit Zuckern angesäuert wurde. Wachstumsversuche mit Glucose und Fructose unter phototrophen und aeroben Bedingungen ließen erkennen, daß es der pH-Abfall war, der unter den gewählten Bedingungen den Übergang in die stationäre Phase bestimmte (Abb.8-11). Es wurde deshalb geprüft, ob Säuren ausgeschieden wurden, namentlich Pyruvat, L-Lactat, D-Lactat, Acetat und Citrat. Nur in Glucosekulturen ließ sich eine geringe Ausscheidung von L-Lactat feststellen. Die Ansäuerung des Mediums dürfte demnach bei der geringen Pufferung (12 mM Phosphat) seine Ursache im NH_4^+-Verbrauch und in der Ausscheidung anderer,nicht geprüfter Säuren gehabt haben.

Elsden und Ormerod (1956) beobachteten, daß Rsp.rubrum auf Acetat und Pyruvat in Gegenwart von Fluoracetat Citronensäure ausscheidet; diese Ausscheidung beruht auf der Hemmung der Aconitase. Dawes und Holmes (1958) erzielten bei Micrococcus (Sarcina) luteus eine Pyruvatausscheidung in Gegenwart von Arsenit, einem Inhibitor der Pyruvat-Dehydrogenase. Durch diese Versuche ange-

Abb.8: Phototrophes Wachstum von Rps.capsulata mit Fructose

500 ml Mineralnährlösung mit Thiamin und Fructose wurden in einem 2l-Rundkolben mit Begasungsaufsatz mit 10 ml Vorkultur beimpft und unter einer Atmosphäre von N_2 bei 3000–4000 Lux bebrütet.



■——■ Trübung
□——□ Protein
●——● Fructose
○——○ pH-Wert
▲——▲ L-Lactat

Abb.9: Aerobes Wachstum von Rps.capsulata mit Fructose

500 ml Mineralnährlösung mit Thiamin und Fructose wurden in einem 2l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 10 ml Vorkultur beimpft und im Dunkeln auf einem Kreisschüttler bei 150 Upm inkubiert.

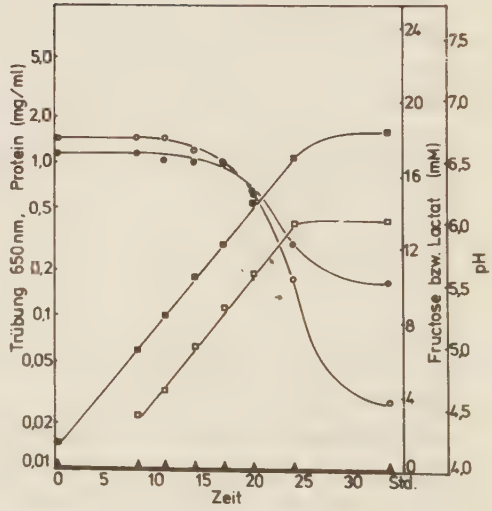
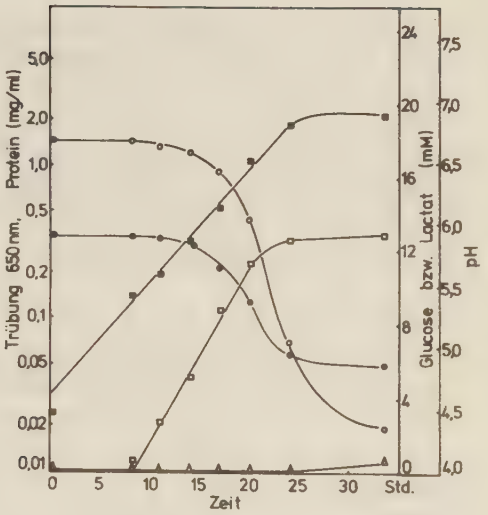


Abb.10: Phototrophes Wachstum von Rps.capsulata mit Glucose

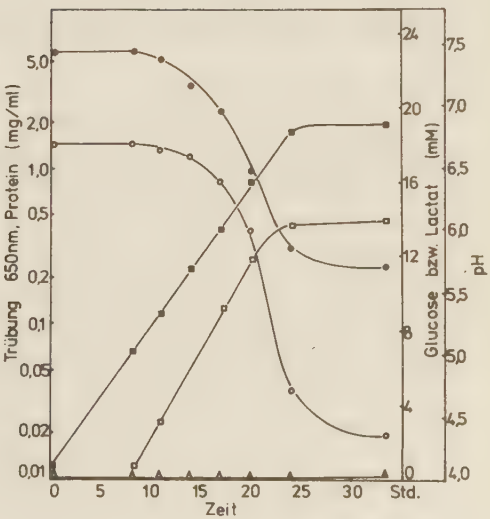
vergleiche Abb.8



■—■ Trübung
□—□ Protein
●—● Glucose
o—o pH-Wert
▲—▲ L-Lactat

Abb.11: Aerobes Wachstum von Rps.capsulata mit Glucose

vergleiche Abb.9



regt, wurde versucht, in Gegenwart der Inhibitoren Fluoracetat oder Arsenit eine Ausscheidung von Säuren in Rps.capsulata zu erzielen. Da unter Wachstumsbedingungen keine Säuren ausgeschieden worden waren, wurden nun ruhende Zellen verwendet und in relativ hoher Zelldichte (E_{650}= 6) entweder anaerob im Licht oder aerob im Dunkeln mit Glucose oder Fructose inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb.12 u.13 dargestellt. Acetat und Citrat wurden in keinem Fall in nachweisbarer Menge ausgeschieden.

Unter phototrophen Bedingungen (Abb.12) wurden mit Fructose selbst in Gegenwart eines Inhibitors nur geringe Mengen an Pyruvat ausgeschieden. Glucose dagegen wurde bereits ohne Inhibitor zu fast 30% als L-Lactat ausgeschieden. Bei Anwesenheit von Arsenit wurden sogar 50% des Glucose-C überwiegend als Lactat und zu einem geringeren Anteil als Pyruvat ausgeschieden. Auch daraus geht hervor, daß Glucose und Fructose über verschiedene Wege abgebaut werden. Wahrscheinlich wurde mit Glucose deshalb mehr Lactat als mit Fructose ausgeschieden, weil im ED-Weg bereits an einer frühen Stelle des Abbaus Pyruvat gebildet wird und die Pyruvatbildung deshalb nicht durch Regulationsmechanismen verhindert werden kann. Beim Abbau der Fructose über den EM-Weg dagegen war eine Regulationskontrolle offenbar möglich.

Unter aeroben Bedingungen (Abb.13) in Abwesenheit eines Inhibitors wurde mit Glucose nur wenig Lactat ausgeschieden, das nach Verbrauch der Glucose wieder verwertet wurde. Mit Fructose trat auch in diesem Fall keine Ausscheidung auf. In Gegenwart des Inhibitors Arsenit wurde sowohl mit Glucose als auch mit Fructose auffallend viel Pyruvat ausgeschieden: etwa 25-30% des Hexose-C. Erstaunlich war der Unterschied von Art und Menge der Ausscheidung unter phototrophen Bedingungen einerseits und aeroben Bedingungen andererseits: Während Glucose im aeroben Experiment zu einer geringeren Ausscheidung führte als im phototrophen, ging der Fructoseabbau mit vergleichsweise starker Säurebildung einher. Außerdem wurde aerob statt Lactat bevorzugt Pyruvat ausgeschieden. Über die Ursachen dieser Unterschiede kann nur spekuliert werden. Dabei dürfte die Tatsache, daß die im aeroben Versuch

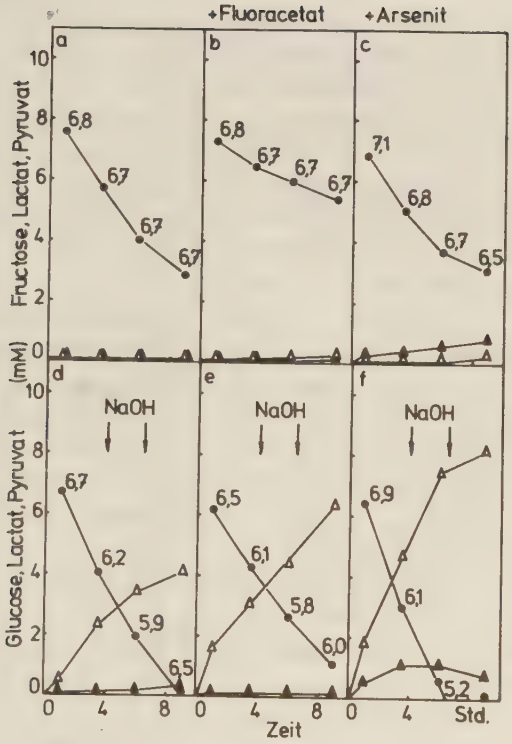


Abb.12: Ausscheidung von Pyruvat und Lactat durch ruhende Zellen von Rps.capsulata mit Glucose oder Fructose als Substrat unter phototrophen Bedingungen

Der Versuch wurde anaerob im Licht durchgeführt (Methoden 6). Die Zellen waren auf Glucose bzw. Fructose phototroph angezogen worden. Der Ansatz enthielt: 30 ml Zellsuspension, E_{650}=6, in 12 mM $NaKPO_4$-Puffer pH 6,9 , ca.300 µmole Glucose bzw.Fructose, außerdem 24 µmole Na-Fluoracetat (Abb.12b,e) bzw. 150 µmole Na-Arsenit (Abb.12c,f).

a,b,c) Fructosezellen d,e,f) Glucosezellen

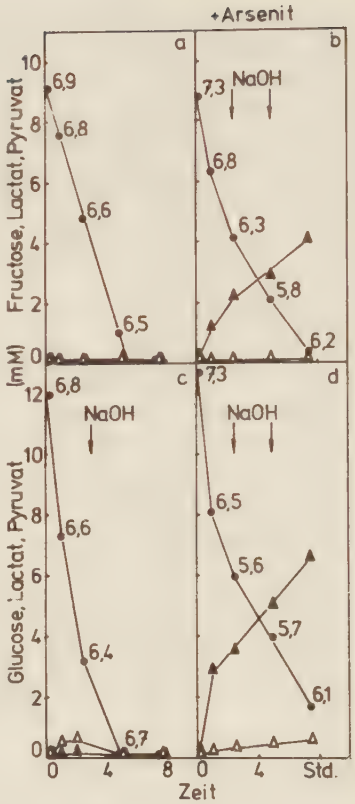
Symbole siehe Abb.13

Abb.13: Ausscheidung vonPyruvat und Lactat durch ruhende Zellen von Rps.capsulata mit Glucose oder Fructose als Substrat unter aeroben Bedingungen

Der Versuch wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt (Methoden 6). Die Zellen waren auf Glucose bzw.Fructose aerob angezogen worden.
vergleiche Abb.12

a,b) Fructosezellen
c,d) Glucosezellen

●—● Substrat
▲—▲ L-Lactat
▲—▲ Pyruvat
Zahl = pH-Wert
↓ Zugabe von 30 bzw. 50 µl 1 N NaOH



gebildeten Reduktionsäquivalente durch Endoxidation beseitigt werden können, ebenso eine Rolle spielen wie die Anwesenheit von Luft-CO_2. Wahrscheinlich war durch das CO_2 im aeroben eine teilweise Umgehung des Blocks der Pyruvat-DH durch heterotrophe CO_2-Fixierung möglich.

b) Einbauversuch:

Ruhende Zellen von Rps.capsulata schieden also in Gegenwart von Arsenit mit Glucose und Fructose als Substrat Lactat bzw. Pyruvat aus. Ein Einbau von positions-markierter ^{14}C-Hexose in Ausscheidungsprodukte war somit möglich. Für den Einbau von 1-^{14}C-Glucose bzw. -Fructose nach dem oben geschilderten Schema (Abb.7) bot sich insbesondere die Pyruvatausscheidung unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von Arsenit an (Abb.13b,d): Das aerobe Experiment war nämlich einfacher durchzuführen als das anaerobe; außerdem erfolgte die Ausscheidung des Pyruvats mit Glucose und Fructose in vergleichbarer Menge. Zu bedenken ist, daß das ausgeschiedene Pyruvat nicht notwendigerweise zu gleichen Teilen aus beiden C_3-Teilen der Hexose stammt, sondern daß C1,2,3 der Hexose bevorzugt vor C4,5,6 ausgeschieden werden kann. Bei Verwendung von 1-^{14}C-Hexose zusammen mit U-^{14}C-Hexose als Kontrolle stellt diese Asymmetrie jedoch keine Fehlerquelle bei der Beurteilung des Abbauweges dar.

Nach der Durchführung des Experiments mit 1-^{14}C- bzw. U-^{14}C-Glucose und -Fructose wurde das ausgeschiedene Pyruvat aus dem Medium des Ansatzes mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie isoliert. 60-70% der im Zellüberstand enthaltenen Radioaktivität wurden im isolierten Pyruvat wiedergefunden; das entsprach etwa 40-50% der Radioaktivität der eingesetzten Glucose und Fructose. Die Ausbeute an Pyruvat war also in diesem Versuch höher als in den Vorversuchen (Abb.13). Diese höhere Ausbeute ist wahrscheinlich auf die leicht modifizierten Versuchsbedingungen (geringere Hexosekonzentration, kürzere Inkubationszeit) zurückzuführen. Da sowohl 1-^{14}C- als auch U-^{14}C-Hexose nahezu gleichviel radioaktives Pyruvat lieferte, kann angenommen werden, daß keine der beiden C_3-Hälften der Hexose bevorzugt ausgeschieden worden ist.

Das isolierte Pyruvat wurde unter Katalyse von Ce(IV)-sulfat decarboxyliert (Tabelle 7). Die Ausbeute an $^{14}CO_2$ aus Pyruvat, das aus U-^{14}C-Hexose gebildet worden ist, sollte theoretisch 33,3% betragen, denn jedes C-Atom des Pyruvats sollte gleich stark markiert sein. In der Regel ist diese Ausbeute jedoch auf Grund

Tabelle 7: Decarboxylierung des von Rps.capsulata auf positionsmarkierter Hexose ausgeschiedenen Pyruvats

Substrat für die Pyruvatausscheidung	eingesetztes Pyruvat (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) nach Decarboxylierung des Pyruvats in		
		CO_2	Acetat	Gesamt
U-^{14}C-Glucose	290 284	29,1[1)]	72,1	101,2
1-^{14}C-Glucose	228 923	74,6	25,3	99,9
U-^{14}C-Fructose	258 204	26,9	74,6	100,5
1-^{14}C-Fructose	225 823	15,6	85,7	101,3

1) Die Decarboxylierung wurde in 3 Parallelen durchgeführt; die Abweichung vom Mittelwert betrug maximal 1,1%.

Aerob gewachsene Zellen wurden in Gegenwart von positions-markierter Hexose inkubiert. Das aus der Hexose gebildete Pyruvat wurde mit Hilfe von Ionenaustausch-Chromatographie aus dem Medium isoliert, unter Katalyse von Ce(IV)-sulfat decarboxyliert und die Radioaktivität der Decarboxylierungsprodukte bestimmt. Details der Durchführung siehe Methoden 19.

Tabelle 8: Prozentualer Anteil des aus 1-^{14}C-Hexose gebildeten Pyruvats mit der Markierung in der Carboxylgruppe oder im Acetatrest

Substrat für die Pyruvatausscheidung	Anteil (%) des ausgeschiedenen Pyruvats markiert in	
	Carboxylgruppe	Acetatrest
1-^{14}C-Glucose	86 ± 3[1)]	14 ± 3
1-^{14}C-Fructose	19 ± 1	81 ± 1

1) Die prozentualen Anteile wurden nach einer Korrektur der Werte aus Tabelle 7 erhalten. Die Korrektur erfolgte auf Grund der prozentualen Abweichung der $^{14}CO_2$-Ausbeute des auf U-^{14}C-Hexose ausgeschiedenen Pyruvats vom erwarteten Wert von 33,3% unter Berücksichtigung der Gesamtausbeute und eines Meßfehlers von 1%.

der Verdünnung der Radioaktivität durch heterotrophe Fixierung von kaltem CO_2 niedriger (Dawes und Holmes 1958). Der auf diesen Verdünnungseffekt zurückzuführende Ausbeuteverlust wurde benutzt, um die $^{14}CO_2$-Ausbeute des aus 1-^{14}C-Hexose gebildeten Pyruvats zu korrigieren (Tabelle 8).

Das Ergebnis zeigt (Tabelle 8), daß das radioaktive Pyruvat aus 1-^{14}C-Fructose zu 81% im Acetatrest, das aus 1-^{14}C-Glucose zu 86% in der Carboxylgruppe markiert war. Fructose wurde also hauptsächlich über den EM-Weg, Glucose über den ED-Weg abgebaut. Es muß jedoch erklärt werden, warum das ausgeschiedene Pyruvat nicht nur in einem C-Atom markiert war. Im Falle der 1-^{14}C-Fructose könnte der Anteil von 19% an Pyruvat mit der Markierung in der Carboxylgruppe von einer Beteiligung des ED-Weges am Fructoseabbau herrühren. Im Falle der 1-^{14}C-Glucose könnte der im Acetatrest markierte Anteil von 14% mit der Beteiligung von Transketolase- und Transaldolasereaktionen erklärt werden (Clark et al. 1971, Ljungdahl et al.1961, Stackebrandt und Kandler 1974). Ein Einfluß dieser Reaktionen auf die Radioaktivitätsverteilung ist besonders deshalb denkbar, da der Einbauversuch mit ruhenden Zellen und in Gegenwart eines Hemmstoffs ausgeführt worden ist. Der Fructoseabbau über den EM-Weg wird von Transketolase- und Transaldolasereaktionen nicht betroffen, da auf Grund der enzymatischen Untersuchungen Fructose über F-1-P statt über F-6-P abgebaut wird. Jedoch würde der Anteil des ED-Weges am Fructoseabbau dann um den Prozentsatz unterschätzt werden, den das aus 1-^{14}C-Glucose gebildete Pyruvat mit Markierung im Acetatrest ausmachte (14%). Unter der Annahme, daß in Rps.capsulata der PP-Weg keine Rolle spielt, würde Fructose dann zu etwa 22% über den ED-Weg und zu 78% über den EM-Weg abgebaut werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Fructose hauptsächlich über den EM-Weg abgebaut wird. Der ED-Weg ist nur in geringem Maß beteiligt. Es muß jedoch bedacht werden, daß die Bedingungen, unter denen die Messung erfolgte, keine Wachstumsbedingungen waren. Der Einfluß des Arsenits auf die Verteilung der Hexose auf verschiedene Abbauwege läßt sich nicht abschätzen.

1.6. Radiorespirometrische Versuche

Eine Möglichkeit, Zuckerabbauwege unter Wachstumsbedingungen zu erforschen, stellt die Radiorespirometrie dar; sie ist von Wang et al.(1958) entwickelt worden. Mit ihr wird die Ausbeute an $^{14}CO_2$ bei der Veratmung positions-markierter Hexosen bestimmt. Diese Ausbeute wird umso höher sein, je früher im Abbauweg das $^{14}CO_2$ aus einer bestimmten Position durch Decarboxylierung freigesetzt wird. Bei der Veratmung von Zuckern wird in abnehmender Ausbeute bei folgenden Reaktionen CO_2 freigesetzt: bei der 6PG-Dehydrogenierung, der Pyruvat-Dehydrogenierung und im Tricarbonsäurecyclus (TCC). Entsprechend ist bei verschiedenen Zuckerabbauwegen die Ausbeute an $^{14}CO_2$ aus den einzelnen C-Atomen der Hexose verschieden. Die Reihenfolge der Freisetzung von $^{14}CO_2$ und dementsprechend seine Ausbeute ist bei den einzelnen Abbauwegen folgende:

EM-Weg: (3-C)=(4-C)>(2-C)=(5-C)>(1-C)=(6-C)

ED-Weg: (1-C)=(4-C)>(2-C)=(5-C)>(3-C)=(6-C)

PP-Weg: (1-C)>(2-C)>(3-C),(4-C),(5-C),(6-C)

Der Grund für diese Reihenfolge läßt sich leicht an einem Schema (Abb.14) klarmachen:

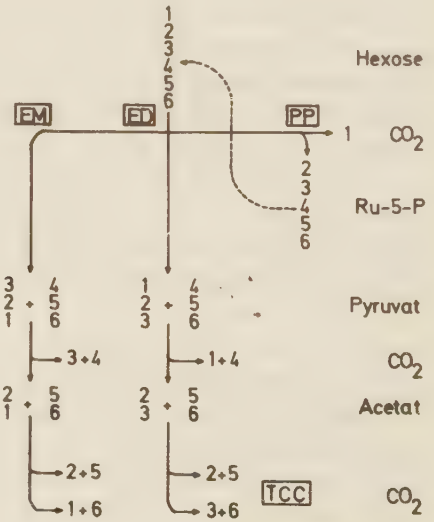


Abb.14: Schema der Freisetzung von CO_2 aus den C-Atomen der Hexose beim Abbau über den EM-, ED- und PP-Weg

Man erkennt, daß zur Unterscheidung von EM-Weg und ED-Weg besonders die $^{14}CO_2$-Freisetzung aus den C-Atomen 1 und 3 zu beachten ist. Die Ursache liegt in der verschiedenen Orientierung des Pyruvatmoleküls, das aus C1,2,3 der Hexose entsteht, je nachdem ob die Hexose mit der KDPG-Aldolase oder der FDP-Aldolase gespaltet worden ist. Ein Radiorespirometrieexperiment mit positions-markierter Glucose wurde bei Rps.capsulata bereits von Eidels und Preiss (1970) durchgeführt. Das Ergebnis war, daß Glucose ausschließlich über den ED-Weg abgebaut wird. Bevor der Abbau von Fructose untersucht werden konnte, mußte zunächst positionsmarkierte Fructose aus der entsprechenden Glucose hergestellt werden. Nach der hierfür modifizierten und optimierten Methode von Muntz und Carroll (1960) wurde 2-^{14}C-, 3-^{14}C- und 3,4-^{14}C-Fructose präpariert.

Das Radiorespirometrieexperiment von Eidels und Preiss (1970) mit Glucose wurde unter modifizierten Versuchsbedingungen bestätigt (Abb.15, Tabelle 9). Mit (1-C)=(4-C)>(2-C)>(3-C)=(6-C) in der Reihenfolge der Geschwindigkeiten, mit denen $^{14}CO_2$ aus den einzelnen C-Atomen der Glucose freigesetzt wurde, ergab sich das klare Bild eines Glucoseabbaus über den ED-Weg. $^{14}CO_2$ aus C1 wurde etwas schneller freigesetzt als aus C4. Dies ist jedoch leicht verständlich, da C4 aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat-Anteil der KDPG-Aldolase-Reaktion stammt und erst in fünf weiteren enzymatischen Schritten zu Pyruvat umgewandelt wird, bevor eine Decarboxylierung erfolgen kann.

Beim entsprechenden Radiorespirometrieexperiment mit Fructose entsprach die Reihenfolge der Raten der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus den einzelnen C-Atomen mit (3-C)=(4-C)>(1-C)>(2-C)>(6-C) ziemlich genau der für den EM-Weg zu erwartenden Verteilung (Abb.16, Tabelle 10). Die $^{14}CO_2$-Ausbeute aus C1 war jedoch höher als aus C2 und C6. Gleichzeitig war auch die Ausbeute aus C4 etwas höher als aus C3. Dies könnte auf eine geringe Beteiligung des ED-Weges am Fructoseabbau zurückzuführen sein. Die Berechnung der prozentualen Anteile von EM- und ED-Weg am Fructosestoffwechsel war jedoch mit der hier verwendeten Radiorespirometriemethode

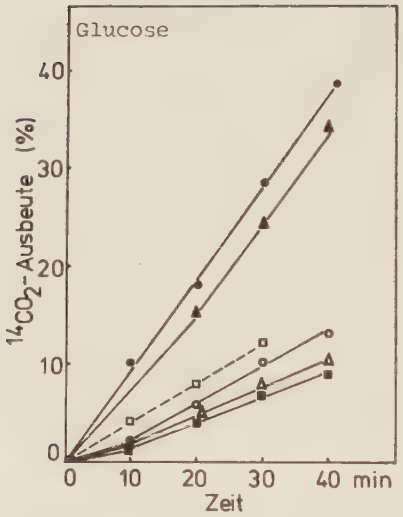


Abb.15:

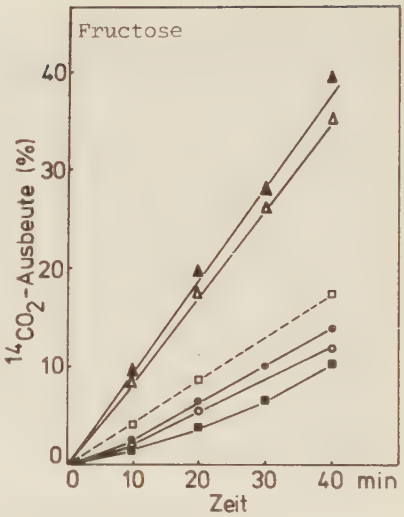


Abb.16:

Radiorespirometrieversuch mit ^{14}C-Glucose und -Fructose bei Rps.capsulata

Details zur Versuchsdurchführung siehe Methoden 21.
Der Ansatz enthielt: 0,8 ml Zellsuspension (Glucose- bzw.Fructosezellen), E_{650}=2, in Mineralnährlösung mit Thiamin, 0,2 ml 10 mM Hexose-Lsg.(positions-markiert); Radioaktivität pro Ansatz siehe Tabelle 9 bzw.10. Jeder Punkt der Abbildung entspricht je einem Ansatz. Die Ansätze wurden nach verschiedenen Zeiten mit 0,1 ml 4 N HCl abgestoppt.
Die $^{14}CO_2$-Ausbeute mit 4-^{14}C-Hexose wurde aus der Ausbeute mit 3-^{14}C- und 3,4-^{14}C-Hexose berechnet: (4-^{14}C)=2x(3,4-^{14}C)-(3-^{14}C).

●—● 1-^{14}C-Hexose ▲—▲ 3-^{14}C-Hexose ■—■ 6-^{14}C-Hexose
○—○ 2-^{14}C-Hexose ▲—▲ 4-^{14}C-Hexose □---□ U-^{14}C-Hexose

nicht möglich, denn hierfür müßten die $^{14}CO_2$-Ausbeuten aus den einzelnen C-Atomen nach vollständigem Verbrauch der Fructose gemessen werden (Wang et al.1958, Katz und Wood 1963). Jedoch läßt sich aus den Ergebnissen ableiten, daß der überwiegende Anteil der Fructose über den EM-Weg abgebaut wurde. Eine Beteiligung des PP-Weges war auszuschließen, da in diesem Fall die $^{14}CO_2$-Ausbeute aus der 1-Stellung wesentlich größer hätte sein müssen.

Tabelle 9: Radioaktivitätsausbeuten des Radiorespirometrieversuchs mit ^{14}C-Glucose bei Rps.capsulata

Substrat	eingesetzte ^{14}C-Glucose (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) am Ende des Versuchs in			
		CO_2	Zellen	Medium	Gesamt
1-^{14}C-Glucose	183 307	39	9	49	97
2-^{14}C-Glucose	207 445	13	20	55	88
3-^{14}C-Glucose[1)]	182 964	8	16	70	94
3,4-^{14}C-Glucose	204 570	22	17	49	88
6-^{14}C-Glucose	188 073	9	24	55	88
U-^{14}C-Glucose	166 174	21	21	48	90

1) Radioaktivitätsausbeute nach 30 min Inkubation

Tabelle 10: Radioaktivitätsausbeuten des Radiorespirometrieversuchs mit ^{14}C-Fructose bei Rps.capsulata

Substrat	eingesetzte ^{14}C-Fructose (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) am Ende des Versuchs in			
		CO_2	Zellen	Medium	Gesamt
1-^{14}C-Fructose	152 056	14	31	42	87
2-^{14}C-Fructose	146 654	12	27	45	84
3-^{14}C-Fructose	155 964	35	19	41	95
3,4-^{14}C-Fructose	171 627	37	18	53	108
6-^{14}C-Fructose	65 127	10	34	45	89
U-^{14}C-Fructose	171 080	17	22	53	92

Um die Frage zu prüfen,ob im Fructosestoffwechsel ein geringer Anteil des ED-Weges tatsächlich eine Rolle spielt, wurde der Radiorespirometrieversuch mit der Glucose$^-$-Mutante GP33 wiederholt, die ja auf Grund der fehlenden G-6-P-DH keinen ED-Weg besitzt (Abb.17, Tabelle 11). Auch für die Mutante ergab sich deutlich das radiorespirometrische Bild des EM-Weges. Außerdem war nun die $^{14}CO_2$-Ausbeute aus C1 tatsächlich gleich der aus C6, wie es für 100% EM-Weg zu erwarten war. Gleichzeitig war jedoch

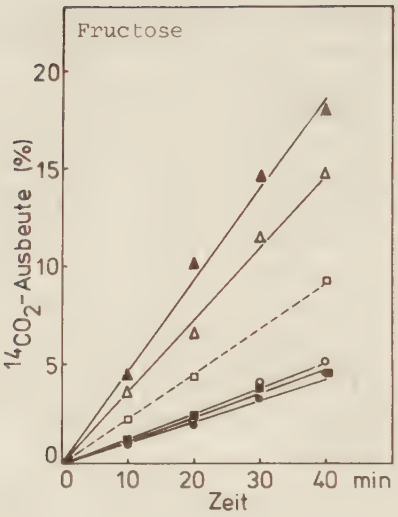


Abb.17: Radiorespirometrieversuch mit ^{14}C-Fructose bei der Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps.capsulata

vergleiche Abb.15 u.16
pro Ansatz eingesetzte Radioaktivität: siehe Tabelle 11
Symbole: siehe Abb.15 u.16

Tabelle 11: Radioaktivitätsausbeuten des Radiorespirometrieversuchs mit ^{14}C-Fructose bei der Glucose$^-$-Mutante GP33

Substrat	eingesetzte ^{14}C-Fructose (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) am Ende des Versuchs in			
		CO_2	Zellen	Medium	Gesamt
1-^{14}C-Fructose	147 014	5	21	77	103
2-^{14}C-Fructose[1)]	146 296	4	14	84	106
3-^{14}C-Fructose	157 180	15	10	80	105
3,4-^{14}C-Fructose[1)]	168 841	13	8	82	103
6-^{14}C-Fructose	67 172	4	16	83	103
U-^{14}C-Fructose	163 775	9	17	74	100

1) Radioaktivitätsausbeute nach 30 min Inkubation

die $^{14}CO_2$-Ausbeute aus C4 deutlich größer als aus C3. Eine Ungleichwertigkeit von C3 und C4 bei radiometrischen Versuchen kann auf einer mangelhaften Gleichgewichtseinstellung durch die Triosephosphatisomerase beruhen (Rose et al.1962). Hierdurch wird Glycerinaldehyd-3-phosphat schneller abgebaut als Dihydroxyacetonphosphat, welches ja auch zur Lipidsynthese bereitgestellt werden muß. Die höheren $^{14}CO_2$-Ausbeuten aus C4 im Vergleich zu C3 könnten also hiermit erklärt werden. Da die Ungleichwertigkeit von C3 und C4 im Wildtyp aber nicht so ausgeprägt war, läßt sich das Ergebnis des Radiorespirometrieexperiments mit der Mutante nicht zur Entscheidung der Frage heranziehen, ob der ED-Weg beim Fructoseabbau eine signifikante Rolle spielt. Da das Muster der Radiorespirometrie bei Wildtyp und Mutante in den wesentlichen Punkten vergleichbar ist und die Mutante über keinen ED-Weg verfügt, erscheint die Beteiligung des ED-Weges am Fructoseabbau unwahrscheinlich.

Auf Grund der enzymatischen Ergebnisse, der Eigenschaften einer Glucose$^-$-Mutante und der radiometrischen Untersuchungen läßt sich der Hexosestoffwechsel von Rps.capsulata wie folgt zusammenfassen: Rps.capsulata baut Fructose über den EM-Weg ab. Der EM-Weg liegt in diesem Bakterium in der modifizierten Form vor, bei der Fructose über F-1-P anstatt F-6-P umgesetzt wird. Es konnte somit gezeigt werden, daß in Rps.capsulata Fructose tatsächlich über einen anderen Weg abgebaut wird als Glucose.

2. Der Abbau von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas sphaeroides

Rhodopseudomonas sphaeroides war das erste phototrophe Bakterium, dessen Zuckerstoffwechsel näher untersucht worden war (Szymona und Doudoroff 1960). Seitdem wird angenommen, daß in diesem Organismus die Hexosen über den ED-Weg abgebaut werden. Diese Annahme wurde besonders dadurch unterstützt, daß die G-6-P-DH und die anderen Enzyme des ED-Weges von Glucose und Fructose induziert werden (Ohmann et al.1969).

In Rps.capsulata einem nahe verwandten Bakterium, wird auf Grund der oben dargelegten Ergebnisse Glucose zwar über den ED-Weg, Fructose aber über den EM-Weg abgebaut. Die 1-PFK ist zwar in Rps.sphaeroides noch nicht nachgewiesen worden, aber es ist bekannt, daß dieses Bakterium ein PEP-Fructose-PTS besitzt, das Fructose in 1-Stellung phosphoryliert (Saier et al.1971). Es erschien deshalb wahrscheinlich, daß auch in Rps.sphaeroides wie in Rps.capsulata Fructose über den EM-Weg abgebaut wird.

2.1. Enzymatische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023

In aerob und phototroph auf Malat, Glucose und Fructose gewachsenen Zellen von Rps.sphaeroides 17023 wurden die wichtigen Enzyme des Hexosestoffwechsels geprüft (Tabelle 12). Hierbei ergab sich ein Bild, das dem in Rps.capsulata (Tabelle 1) sehr ähnlich war, so daß hier nur die wesentlichen Merkmale erörtert werden sollen: Die 1-PFK war auch in Rps.sphaeroides vorhanden und wurde durch Fructose induziert. Die G-6-P-DH, 6PG-Dehydratase und KDPG-Aldolase wurden auch in diesem Bakterium von Glucose und Fructose induziert. Im Gegensatz zu Rps.capsulata konnte jedoch eine NAD-spezifische 6PG-DH nachgewiesen werden. Auch Szymona und Doudoroff (1960) fanden eine geringe Aktivität dieses Enzyms, schrieben dies aber einer Nebenreaktion im Rohextrakt zu. In einem anderen Stamm, Rps.sphaeroides 1760-1 (Tabelle 15), konnte jedoch keine 6PG-DH nachgewiesen werden (Ohmann et al. 1969), so daß anzunehmen ist, daß dieses Enzym im Stoffwechsel von Rps.sphaeroides keine große Rolle spielt.

Tabelle 12: Enzyme des Zuckerstoffwechsels von Rps.sphaeroides 17023 nach Anzucht auf Malat, Glucose und Fructose

Enzym	Spez. Aktivität (mE/mg) nach Wachstum aerob im Dunkeln[1] (anaerob im Licht[2]) auf					
	Malat		Glucose		Fructose	
Glucokinase	85		86		83	
Fructokinase	26		29		31	
Phosphoglucose-isomerase	322		1126		1239	
Phosphofructo-mutase					n.n.[3]	(n.n.)
G-6-P-DH NADP	31	(10)[2]	262	(34)	320	(17)
6PG-DH NADP	<2		<2		<2	
NAD	8		25		23	
6PG-Dehydratase	24	(10)	263	(162)	269	(118)
+ KDPG-Aldolase	172		792		947	
1-PFK	16	(2)	18	(2)	354	(47)
6-PFK	25	(2)	19	(5)	30	(3)
FDP-Aldolase	2		<2		3	
FDPase	14		12		18	

1) Die Mineralnährlösung enthielt 0,01% Hefeextrakt.

2) Die Klammern enthalten die Werte nach Anzucht anaerob im Licht. Die Mineralnährlösung enthielt 0,05% Hefeextrakt.

3) n.n. = nicht nachweisbar

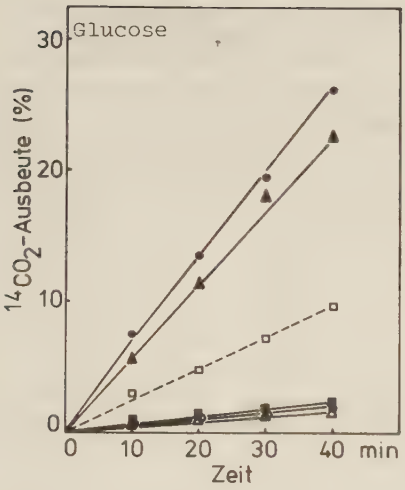
Auch hinsichtlich der nur geringen FDP-Aldolase-Aktivität war Rps.sphaeroides von Rps.capsulata verschieden. Auf die geringe FDP-Aldolase-Aktivität wurde bereits von Szymona und Doudoroff (1960) hingewiesen. Willard et al.(1965) erzielten aber bei diesem Enzym durch Modifikation der Zellauschluß- und Enzymtestbedingungen wesentlich höhere Aktivitäten. Ein letzter wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Organismen bestand darin, daß Rps.sphaeroides eine deutlich höhere Fructokinaseaktivität besaß; in diesem Bakterium kann also eine Phosphorylierung von Fructose in 6-Stellung stattfinden.

Auffallend waren die generell niedrigeren Enzymaktivitäten in phototroph gewachsenen Zellen im Vergleich zu aerob gewachsenen Zellen. Die Ursache dafür kann in der Hefeextraktkonzentration liegen, die bei phototrophen Kulturen fünfmal höher war als bei aeroben. Für einen direkten Einfluß der phototrophen Bedingungen auf die Höhe der Enzymniveaus sprechen aber die Ergebnisse von Ohmann et al.(1969): Die Autoren stellten eine starke Reduktion der spezifischen Aktivität der G-6-P-DH und der anderen Enzyme des ED-Weges fest, wenn die Zellen anaerob im Licht angezogen worden waren.

2.2. Radiorespirometrische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023

Die enzymatische Untersuchung von Rps.sphaeroides ergab hinsichtlich der Enzyme des EM- und ED-Weges viele Gemeinsamkeiten mit Rps.capsulata. Der Glucose- und Fructosestoffwechsel schien somit bei beiden Arten der gleiche zu sein. Es galt nun, diese auf Grund der enzymatischen Ergebnisse erkennbare Gemeinsamkeit mit Hilfe der Radiorespirometrie abzusichern.

Ein Radiorespirometrieexperiment mit positions-markierter Glucose ergab das deutliche Bild des ED-Weges (Abb.18, Tabelle 13). Die Reihenfolge der Geschwindigkeiten, mit denen $^{14}CO_2$ aus den einzelnen C-Atomen der Glucose freigesetzt wurde, war: (1-C)> (4-C)≫(2-C)=(3-C)=(6-C). Die etwas größere $^{14}CO_2$-Ausbeute aus C1 gegenüber C4 war wahrscheinlich nicht auf eine Beteiligung des PP-Weges zurückzuführen, da die Ausbeute aus C2 hierfür zu gering war; die Ursache wird wahrscheinlich wie bei Rps.capsulata darin zu suchen sein, daß nach der KDPG-Aldolasereaktion Pyruvat und GAP verschieden schnell weiterabgebaut werden. Im Gegensatz zu Rps.capsulata war die äußerst geringe $^{14}CO_2$-Ausbeute aus C2, C3 und C6 auffallend. Diese geringe Ausbeute war ein Hinweis darauf, daß die Glucose im TCC nicht vollständig oxidiert wurde. Dies ist im Einklang mit dem ausgeprägten Hefeextraktbedürfnis dieses Bakteriums, das bereits von Szymona und Doudoroff (1960) beobachtet worden ist; die Autoren hatten deshalb angenommen, daß Hexosen in erster Linie als C-Quelle dienen und Aminosäuren die Hauptsubstrate für den Energiestoffwechsel sind.



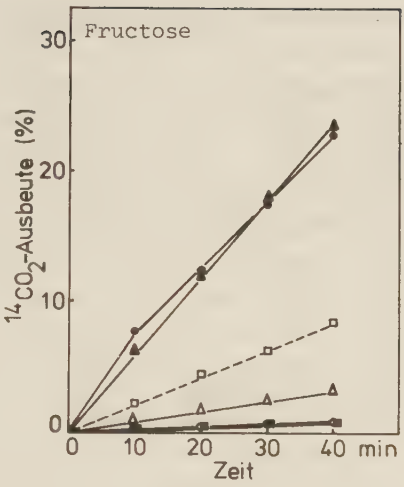


Abb.18: Abb.19:

Radiorespirometrieversuch mit ^{14}C-Glucose und -Fructose bei Rps.sphaeroides 17023

vergleiche Abb.15 u.16
Die Zellen wurden in Mineralnährlösung mit 0,01% Hefeextrakt suspendiert. Radioaktivität pro Ansatz: siehe Tabelle 13 bzw.14.

●—● 1-^{14}C-Hexose ▲—▲ 3-^{14}C-Hexose ■—■ 6-^{14}C-Hexose
o—o 2-^{14}C-Hexose ▲—▲ 4-^{14}C-Hexose □---□ U-^{14}C-Hexose

Während die radiorespirometrischen Ergebnisse des Glucoseabbaus weitgehend denen von Rps.capsulata entsprachen, war das Resultat der entsprechenden Versuche mit Fructose überraschend (Abb. 19, Tabelle 14). Im Gegensatz zu Rps.capsulata baute Rps.sphaeroides auch die Fructose hauptsächlich über den ED-Weg ab. Die Geschwindigkeit der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus den einzelnen C-Atomen der Fructose war: (1-C)=(4-C)$\geqslant$(3-C)>(2-C)=(6-C). Im Vergleich zum Radiorespirometrieexperiment mit Glucose bestanden lediglich zwei Unterschiede: C1 und C4 der Fructose waren gleichwertig, und auch aus C3 wurde $^{14}CO_2$ freigesetzt. Beide Unterschiede zeigten, daß am Fructoseabbau auch der EM-Weg beteiligt war; der Anteil des EM-Weges war aber relativ gering.

Tabelle 13: Radioaktivitätsausbeuten des Radiorespirometrieversuchs mit ^{14}C-Glucose bei Rps.sphaeroides 17023

Substrat	eingesetzte ^{14}C-Glucose (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) am Ende des Versuchs in			
		CO_2	Zellen	Medium	Gesamt
1-^{14}C-Glucose	192 198	26	3	71	100
2-^{14}C-Glucose	172 137	2	17	72	91
3-^{14}C-Glucose	184 407	2	16	73	91
3,4-^{14}C-Glucose	209 177	12	7	74	93
6-^{14}C-Glucose	191 756	2	8	73	83
U-^{14}C-Glucose	179 042	10	13	67	90

Tabelle 14: Radioaktivitätsausbeuten des Radiorespirometrieversuchs mit ^{14}C-Fructose bei Rps.sphaeroides 17023

Substrat	eingesetzte ^{14}C-Fructose (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) am Ende des Versuchs in			
		CO_2	Zellen	Medium	Gesamt
1-^{14}C-Fructose	144 222	23	5	68	96
2-^{14}C-Fructose	151 436	1	11	71	83
3-^{14}C-Fructose	163 551	3	13	72	88
3,4-^{14}C-Fructose	177 187	13	8	71	92
6-^{14}C-Fructose	67 613	1	13	64	78
U-^{14}C-Fructose	174 497	8	6	72	86

Die geringe Beteiligung des EM-Weges am Fructoseabbau war in Hinblick auf die ausgeprägte Induktion der 1-PFK überraschend. Dies macht eindringlich klar, wie vorsichtig man sein muß, wenn man den Stoffwechselweg eines Zuckers ausschließlich auf Grund von enzymatischen Untersuchungen beurteilen will.

2.3. Enzymatische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 1760-1

Das Ergebnis der Radiorespirometrieversuche mit Rps.sphaeroides 17023 machte es wünschenswert, die Untersuchung mit einem anderen Stamm derselben Art zu wiederholen. Hierfür stand Rps.sphaeroides 1760-1 zur Verfügung. Dieser Stamm hatte die Eigenschaft, mit Glucose unter aeroben Bedingungen nicht, und unter phototrophen Bedingungen nur sehr schlecht zu wachsen.

Tabelle 15: Enzyme des Zuckerstoffwechsels von Rps.sphaeroides 1760-1 nach Anzucht auf Malat, Glucose und Fructose

Enzym	Spez. Aktivität (mE/mg) nach Wachstum aerob im Dunkeln[1] (anaerob im Licht[2]) auf					
	Malat		Glucose[3]		Fructose	
Glucokinase	38				44	
Fructokinase	16				8	
Phosphoglucose-isomerase	810				1361	
G-6-P-DH NADP	140	(12)[2]	(133)		388	(145)
6PG-DH NADP	n.n.[4]	(n.n.)	(n.n.)		n.n.	(n.n.)
NAD	n.n.	(n.n.)	(n.n.)		n.n.	(n.n.)
6PG-Dehydratase	n.n.	(n.n.)	(n.n.)		n.n.	(n.n.)
KDPG-Aldolase +	195				702	(253)
KDG-Kinase					7	
1-PFK	14	(2)	(2)		122	(40)
6-PFK		(3)	(7)			
FDP-Aldolase	1				2	(8)
FDPase	5				15	(6)

1) Die Mineralnährlösung enthielt 0,01% Hefeextrakt.

2) Die Klammern enthalten die Werte nach Anzucht anaerob im Licht. Die Mineralnährlösung enthielt 0,05% Hefeextrakt.

3) Unter aeroben Bedingungen erfolgte mit Glucose kaum ein Wachstum.

4) n.n. = nicht nachweisbar

Auch bei Stamm 1760-1 wurden die wichtigen Enzyme des Zuckerstoffwechsels geprüft (Tabelle 15). Das Muster der Enzymaktivitäten nach Anzucht mit Malat, Glucose und Fructose war im Prinzip das gleiche wie bei Rps.sphaeroides 17023. Ein wesentlicher Unterschied war jedoch, daß die 6PG-Dehydratase nicht nachweisbar war. Ein Zuckerabbau über den ED-Weg konnte somit in diesem Stamm ausgeschlossen werden. Die KDPG-Aldolase war in hoher Aktivität vorhanden und zwar, ebenso wie in Stamm 17023, in Fructosezellen in höherer Aktivität als in Malatzellen. Dieses Enzym wurde also anscheinend nicht von seinem Substrat KDPG induziert, sondern von anderen Metaboliten wie 6PG oder Triose-phosphat (vgl.Kapitel 1.4).

Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften ähnelte Rps.sphaeroides 1760-1 dem von Szymona und Doudoroff (1960) beschriebenen "wild-type parent strain", während Rps.sphaeroides 17023 eher den Merkmalen des "glucose-strain 1" entsprach. Jedoch konnte Stamm 1760-1 Fructose verwerten.

2.4. Radiorespirometrische Untersuchung von Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 1760-1

Durch das Fehlen der 6PG-Dehydratase konnte in Rps.sphaeroides 1760-1 ein funktionsfähiger ED-Weg ausgeschlossen werden. Da Fructose einigermaßen gut verwertet wurde, und eine mit Fructose induzierbare 1-PFK vorhanden war, lag der Gedanke nahe, daß dieser Stamm Fructose über den EM-Weg abbauen würde.

Ein Radiorespirometrieexperiment mit positions-markierter Fructose (Abb.20, Tabelle 16) ergab folgende Reihenfolge bei der Freisetzung von $^{14}CO_2$ aus den einzelnen Positionen: (4-C)>(3-C)>(1-C)>(2-C)=(6-C). Die hohen $^{14}CO_2$-Ausbeuten mit 4-^{14}C- und 3-^{14}C-Fructose zeigten, daß der Hauptteil der Fructose tatsächlich über den EM-Weg abgebaut wurde. Die wesentlich größere $^{14}CO_2$-Bildung aus C4 zu C3 und aus C1 zu C6 zeigte jedoch, daß auch der ED-Weg zu einem beträchtlichen Teil am Fructoseabbau beteiligt war.

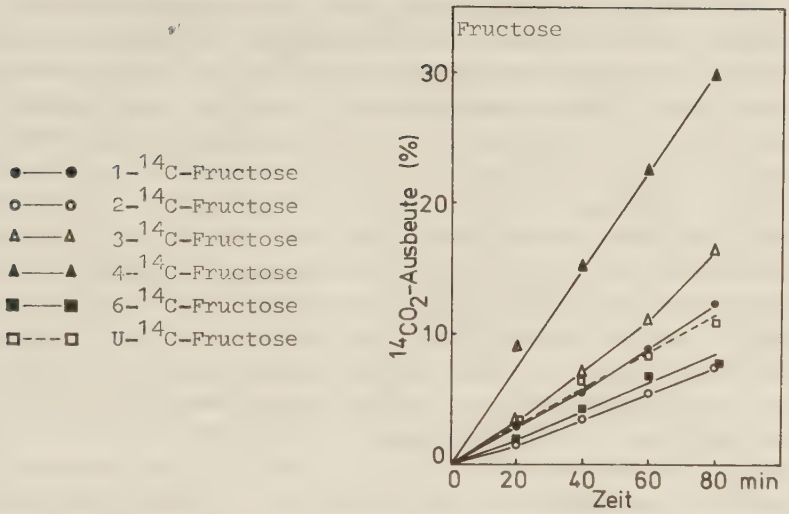


Abb.20: Radiorespirometrieversuch mit ^{14}C-Fructose bei Rps.sphaeroides 1760-1

vergleiche Abb.15 u.16
Die Zellen wurden in Mineralnährlösung mit 0,01% Hefeextrakt zu einer Trübung von E_{650}=3 suspendiert. Radioaktivität pro Ansatz: siehe Tabelle 16.

Tabelle 16: Radioaktivitätsausbeuten des Radiorespirometrieversuchs mit ^{14}C-Fructose bei Rps.sphaeroides 1760-1

Substrat	eingesetzte ^{14}C-Fructose (dpm)	Radioaktivitätsausbeute (%) am Ende des Versuchs in			
		CO_2	Zellen	Medium	Gesamt
1-^{14}C-Fructose	142 145	12	15	69	96
2-^{14}C-Fructose	148 842	8	23	67	98
3-^{14}C-Fructose	165 307	16	15	67	98
3,4-^{14}C-Fructose	180 301	23	11	59	93
6-^{14}C-Fructose	67 210	7	23	53	83
U-^{14}C-Fructose	175 079	11	16	64	91

Da der untersuchte Stamm 1760-1 keine 6PG-Dehydratase besaß, stellte sich die Frage, wie ein Abbau über den ED-Weg dann möglich sein konnte. Hierbei ist zu bedenken, daß die Radiorespirometrie nicht zwischen verschiedenen Abbauwegen unterscheiden kann, solange die für den jeweiligen Abbauweg charakteristische Aldolasespaltung des C_6-Moleküls und die daran anschließenden Decarboxylierungsreaktionen erhalten bleiben. Dies ist aber auch bei einem modifizierten ED-Weg (KDG-Weg) möglich, wie er erstmals gerade für Rps.sphaeroides (Szymona und Doudoroff 1960) und später auch für Clostridien (Andreesen und Gottschalk 1969, Bender et al.1971) beschrieben worden ist. Für den KDG-Weg spielt das in Stamm 1760-1 fehlende Enzym 6PG-Dehydratase keine Rolle. Hier wird 6PG über Gluconat zu KDG abgebaut, welches mit Hilfe der KDG-Kinase zu KDPG phosphoryliert wird. KDPG wird dann, wie auch im eigentlichen ED-Weg, von der KDPG-Aldolase gespaltet. Die Enzyme des KDG-Weges, 6PG-Phosphatase, Gluconat-Dehydratase und KDG-Kinase, waren in Rps.sphaeroides von Szymona und Doudoroff (1960) nachgewiesen worden. Die KDG-Kinase wurde nun auch in Stamm 1760-1 geprüft (Tabelle 15) und in Fructosezellen in einer vergleichbaren Aktivität wie von Szymona und Doudoroff (1960) nachgewiesen. Der KDG-Weg dürfte somit in Rps.sphaeroides 1760-1 funktionsfähig sein. Dieser Stamm baut also Fructose in erster Linie über den EM-Weg ab, jedoch mit einer deutlichen Beteiligung des KDG-Weges.

2.5. Wachstumsversuche mit Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023 und 1760-1

Die Radiorespirometrieversuche mit Fructose führten bei Rps. sphaeroides zu verschiedenen Ergebnissen, je nachdem welcher Stamm verwendet wurde. Dieses unterschiedliche Verhalten wurde durch die Wachstumsversuche bestätigt (Abb.21). Rps.sphaeroides 1760-1 wuchs unter phototrophen Bedingungen mit Glucose nur sehr langsam mit einer Verdopplungszeit von t_d=17,5 Std. Unter aeroben Bedingungen erfolgte nahezu kein Wachstum (t_d=39 Std.). Dies findet seine Erklärung darin, daß diesem Stamm kein funktionsfähiger ED-Weg, sondern nur der KDG-Weg zur Verfügung stand. Ein Abbau über den KDG-Weg war aber anscheinend nur in begrenztem Umfang möglich.

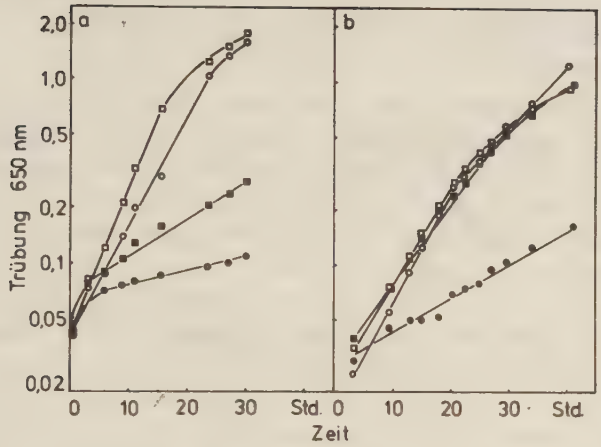


Abb.21: Aerobes und phototrophes Wachstum von Rps.sphaeroides 17023 und 1760-1 auf Glucose und Fructose

Die Wachstumsversuche wurden in 1l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 100 ml Nährlösung (a) oder in Schraubdeckelröhrchen (20 ml) (b) durchgeführt. Die Mineralnährlösung mit 0,01% Hefeextrakt enthielt die Substrate in einer Konzentration von 20 mM (a) bzw. 5 mM (b). Es wurde mit Malatzellen beimpft. In einer Kontrollkultur ohne Substrat war nur ein geringer Trübungszuwachs auf Grund des Hefeextrakts mölich.

a) aerob-dunkel b) anaerob-Licht

offene Symbole = 17023 geschlossene Symbole = 1760-1

○—○ ●—● Glucose □—□ ■—■ Fructose

Rps.sphaeroides 1760-1 wuchs auch mit Fructose unter aeroben Bedingungen nur relativ langsam (t_d=15 Std.), jedoch deutlich besser als mit Glucose. Unter phototrophen Bedingungen wuchs Stamm 1760-1 sogar sehr gut mit Fructose (t_d=4,5 Std.). Wie die radiorespirometrischen Versuche zeigten, wurde Fructose in diesem Stamm offensichtlich über den EM-Weg mit Beteiligung des KDG-Weges abgebaut. Anscheinend ermöglichten diese Abbauwege unter

aeroben Bedingungen ein nur geringes Wachstum, während sie für phototrophes Wachstum ausreichten.

Diese Vorstellung wurde durch das Wachstumsverhalten des anderen Stammes, Rps.sphaeroides 17023, bestätigt. Dieser Stamm wuchs sowohl aerob als auch phototroph ausgezeichnet mit Glucose (t_d= 4 Std.), wahrscheinlich da er über einen voll funktionsfähigen ED-Weg verfügt. Auch Fructose wurde phototroph ebenso gut wie Glucose verwertet (t_d=4,5 Std.). Aerob wuchs er nur geringfügig langsamer (t_d=5 Std.), aber deutlich schneller als Stamm 1760-1. Gleichzeitig wurde Fructose in Rps.sphaeroides 17023 hauptsächlich über den ED-Weg mit nur geringer Beteiligung des EM-Weges abgebaut. Das Vorhandensein des ED-Weges zusätzlich zum EM-Weg und KDG-Weg ermöglichte diesem Stamm anscheinend, mit Fructose unter aeroben Bedingungen besser zu wachsen als ohne ED-Weg.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (Tabelle 17): Der KDG-Weg allein ermöglicht nur eine geringe Wachstumsrate auf Glucose. Fructose wird in Stamm 1760-1 außerdem über den EM-Weg abgebaut. KDG- + EM-Weg sind unter phototrophen Bedingungen ausreichend für eine optimale Wachstumsrate auf Fructose, unter aeroben Bedingungen wird jedoch zusätzlich ein funktionsfähiger ED-Weg benötigt. Daraus läßt sich folgern, daß der EM-Weg unter aeroben Bedingungen weniger funktionstüchtig ist als unter phototrophen Bedingungen. Es liegt auf der Hand, diese Funktionsuntüchtigkeit auf die geringe FDP-Aldolase-Aktivität zurückzuführen.

Diese Annahme wird durch die Arbeit von Willard et al.(1965) unterstützt: Durch Variation der Zellaufschlußbedingungen und durch Zusatz von Fe^{++}-Ionen und Cystein in den Testansatz gelang es ihnen, in Rps.sphaeroides die FDP-Aldolase in höherer spezifischer Aktivität nachzuweisen (80 mE/mg; 38°C). Dies war jedoch nur bei Zellen möglich, die phototroph gewachsen waren. Bei aerob angezogenen Zellen dagegen wurde unter allen Bedingungen eine unverändert niedrige spezifische Aktivität gemessen (2-3 mE/mg; 38°C).

Tabelle 17: Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse der enzymatischen und radiorespirometrischen Untersuchungen im Vergleich zu den Wachstumsraten auf Glucose und Fructose von Rps.sphaeroides 17023 und 1760-1

Versuche		Eigenschaften von Rps.sphaeroides	
		Stamm 17023	Stamm 1760-1
6PG-Dehydratase		+	-
funktionsfähiger ED-Weg		+	-
Verdopplungszeit (Std.) bei Wachstum mit Glucose	phototroph	4	17,5
	aerob	4	39
Abbauweg der Glucose unter aeroben Bedingungen (Ergebnis der Radiorespirometrie)		ED-Weg	nicht geprüft, da kaum Wachstum
Verdopplungszeit (Std.) bei Wachstum mit Fructose	phototroph	4,5	4,5
	aerob	5	15
Abbauweg der Fructose unter aeroben Bedingungen (Ergebnis der Radiorespirometrie)		ED-Weg + (EM-Weg)	EM-Weg + (KDG-Weg)

2.6. Der Abbau von Fructose in Rhodopseudomonas sphaeroides Stamm 17023 unter phototrophen Bedingungen

Nach den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche war anzunehmen, daß der aerobe Abbau der Fructose in Rps.sphaeroides 17023 nur deshalb über den ED-Weg erfolgt, weil unter den gegebenen Bedingungen die Aktivität der FDP-Aldolase zu gering ist. Der phototrophe Abbau der Fructose dagegen könnte in stärkerem Maß oder vielleicht sogar ausschließlich über den EM-Weg erfolgen.

Zur Klärung dieser Möglichkeit war es nötig, die Abbauwege unter phototrophen Bedingungen zu untersuchen. Mit Hilfe der Radiorespirometrie ließ sich diese Untersuchung leider nicht durchführen. Vorversuche mit U-^{14}C-Fructose anaerob im Licht ergaben nämlich nach Verbrauch der Fructose eine $^{14}CO_2$-Ausbeute von maximal 1%. Außerdem ließ sich keine Proportionalität zwischen $^{14}CO_2$-Ausbeute und eingesetzter Zelldichte feststellen.

Es wurde deshalb versucht, den Abbauweg durch Einbau von positions-markierter Fructose in die Carotinoide aufzuklären. Diesem Vorgehen lag prinzipiell der gleiche Gedanke zugrunde wie beim Einbau positions-markierter Zucker in PHB bei Alcaligenes eutrophus (Schlegel und Gottschalk 1965); denn die Carotinoide werden wie PHB aus Acetyl-CoA synthetisiert. Der Einbau positions-markierter Hexose in die Carotinoide erfolgt entsprechend dem jeweiligen Abbauweg wie anhand der Abb.7 bereits erläutert wurde.

Der Versuch zum Einbau positions-markierter Hexose in die Carotinoide wurde mit Rps.sphaeroides 17023 durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Parallelversuch mit Rps.capsulata gemacht, dessen Hexoseabbauwege in Kapitel 1 bereits untersucht und weitgehend aufgeklärt worden waren. Beide Organismen wurden anaerob im Licht mit Glucose und Fructose, die in 1-, 3- und 6-Stellung ^{14}C-markiert waren, angezogen. Außerdem wurde $NaHCO_3$ zugesetzt, um eine Verdünnung des beim Abbau der Hexose anfallenden $^{14}CO_2$ zu erzielen. Nachdem die Kulturen ausgewachsen waren, wurden die Carotinoide durch Extraktion der Zellen und Verseifung des Pigmentextrakts isoliert. Diese Fraktion enthält sowohl bei Rps. sphaeroides als auch bei Rps.capsulata fast nur Spheroidene als Hauptcarotinoid (Eimhjellen und Liaaen-Jensen 1964) mit nur einem geringen Anteil von Spheroidenone und Neurosporene.

Ein Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten von Spheroidene mit denen der Hexose ergab bei Rps.capsulata und Rps.sphaeroides vergleichbare Werte (Tabelle 18). Sowohl bei Rps.sphaeroides als auch bei Rps.capsulata war das Verhältnis der spezifischen Radio-

Tabelle 18: Spezifische Radioaktivität des Spheroidene nach Einbau positions-markierter Hexose in die Carotinoide von Rps.capsulata und Rps.sphaeroides 17023

Wachstumssubstrat	Spez. Radioaktivität (dpm/µmol C) von Hexose	Spheroidene	Spheroidene/Hexose	
1-^{14}C-Fructose	827	9 504	11,5	Rps.capsulata[1]
3-^{14}C-Fructose	787	3 646	4,6	
6-^{14}C-Fructose	794	11 555	14,6	
1-^{14}C-Glucose	748	3 589	4,8	
3-^{14}C-Glucose	756	10 699	14,2	
6-^{14}C-Glucose	731	8 021	11,0	
1-^{14}C-Fructose	805	11 992	14,9	Rps.sphaeroides[2]
3-^{14}C-Fructose	805	8 460	10,5	
6-^{14}C-Fructose	803	13 866	17,3	
1-^{14}C-Glucose	721	4 264	5,9	
3-^{14}C-Glucose	743	7 471	10,1	
6-^{14}C-Glucose	751	7 122	9,5	

1) Die Mineralnährlösung enthielt 5 mM ^{14}C-Hexose, 5 mM $NaHCO_3$ und Thiamin (0,1 mg/l).

2) Die Mineralnährlösung enthielt 5 mM ^{14}C-Hexose, 5 mM $NaHCO_3$ und 0,01% Hefeextrakt.

Die Organismen wurden bis zur stationären Phase auf positionsmarkierter Hexose angezogen. Die Carotinoide wurden durch Extraktion und Verseifung isoliert und ihre spezifische Radioaktivität bezogen auf Spheroidene bestimmt.
Details der Durchführung siehe Methoden 22.

aktivität von Spheroidene zu Hexose bei 3-^{14}C-Fructose und 1-^{14}C-Glucose deutlich niedriger als das entsprechende Verhältnis bei 1-^{14}C- oder 6-^{14}C-Fructose und 3-^{14}C- oder 6-^{14}C-Glucose. Das heißt, daß bei beiden Organismen Fructose hauptsächlich über den EM-Weg, Glucose hauptsächlich über den ED-Weg abgebaut wurde. Das würde bedeuten, daß Rps.sphaeroides 17023 Fructose unter

phototrophen Bedingungen über einen anderen Weg abbaut (überwiegend EM-Weg) als unter aeroben Bedingungen (überwiegend ED-Weg).

Es ist aber noch zu erklären, warum mit 3-^{14}C-Fructose und 1-^{14}C-Glucose überhaupt ein Einbau von Radioaktivität in die Carotinoidfraktion stattfand; in beiden Fällen sollte nämlich die Markierung in diesen Positionen bei der Pyruvat-Dehydrogenierung als $^{14}CO_2$ freigesetzt werden. Da die phototrophe Anzucht der Zellen aber in einem geschlossenen System erfolgte, war eine Refixierung des $^{14}CO_2$ möglich. Diese Refixierung konnte auch durch die Anwesenheit von kaltem CO_2 nicht völlig verhindert werden, da ein vollständiger Austausch zwischen intrazellulärem und extrazellulärem CO_2 offensichtlich nicht immer gegeben ist (Schlegel et al.1961).

Bei der Interpretation der Einbauversuche muß außerdem auch folgendes beachtet werden: Zur Berechnung der spezifischen Radioaktivität wurde die in der Carotinoidfraktion gemessene Radioaktivität auf den Spheroidenegehalt bezogen, da diese Konzentration gemessen werden konnte. Nach Auftrennung der Bestandteile der Carotinoidfraktion mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zeigte sich aber, daß der Hauptteil der Radioaktivität nicht mit den Carotinoiden selbst, sondern mit anderen, noch nicht identifizierten Substanzen verbunden war (Abb.22). Die spezifische Radioaktivität des Spheroidene war also viel zu hoch berechnet worden. Die Einbauversuche können also nur dann sinnvoll interpretiert werden, wenn vorausgesetzt werden kann, daß auch diese unbekannten, radioaktiv markierten Substanzen ebenso wie die Carotinoide aus Acetyl-CoA synthetisiert wurden, und daß das Mengenverhältnis dieser Substanzen zu Spheroidene unter allen Versuchsbedingungen konstant war. - Da aber die Einbauversuche mit Rps.capsulata die Ergebnisse lieferten, die auf Grund seiner Hexoseabbauwege zu erwarten waren, kann angenommen werden, daß daselbe auch für Rps.sphaeroides gilt; Rps.sphaeroides würde also Fructose unter phototrophen Bedingungen tatsächlich über den EM-Weg abbauen.

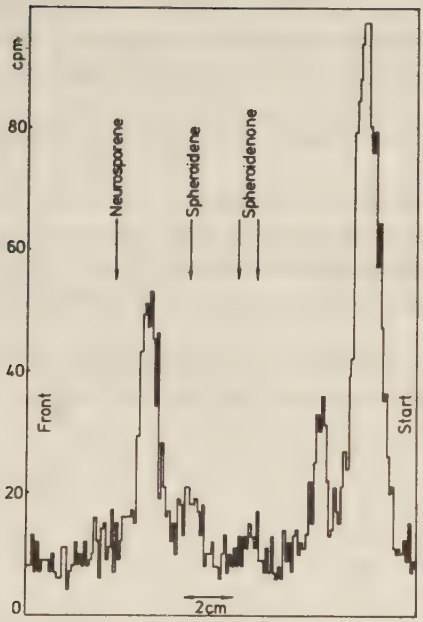


Abb.22: Dünnschichtchromatographie der Carotinoidfraktion von Rps.capsulata

Details der Durchführung siehe Methoden 22. Etwa 1 ml der Carotinoidfraktion von mit 1-^{14}C-Fructose gewachsenen Zellen von Rps.capsulata wurde auf einer Silicagel-Dünnschichtplatte mit Petroläther + 10% Aceton chromatographiert. Die Carotinoidbanden wurden markiert und die Radioaktivitätsverteilung auf der Platte mit Hilfe eines Scanners bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den Hexoseabbau in Rps. sphaeroides (Kapitel 2.1-2.6) anhand der beiden Stämme 17023 und 1760-1 lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:
Der KDG-Weg besitzt eine sehr geringe Kapazität für den Abbau der Hexosen; er kann den ED-Weg bei Funktionsunfähigkeit nur in begrenztem Umfang ersetzen. Glucose wird immer über den ED-Weg abgebaut. Fructose wird unter phototrophen Bedingungen hauptsächlich über den EM-Weg, unter aeroben Bedingungen aber zum größten

Teil über den ED-Weg abgebaut, denn die Aktivität der FDP-Aldolase ist unter aeroben Bedingungen wahrscheinlich nicht ausreichend für die Funktionsfähigkeit des EM-Weges.

Zur Einschleusung der Fructose in den ED-Weg hat Rps.sphaeroides zwei Möglichkeiten:

1. Fructose wird durch die vorhandene Fructokinaseaktivität in 6-Stellung phosphoryliert. Es muß dann neben dem PEP-Fructose-PTS (Saier et al.1971) noch ein Fructosetransportweg existieren, bei dem Fructose unphosphoryliert in die Zelle gelangt.
2. Fructose wird mit Hilfe des PEP-Fructose-PTS und der 1-PFK zu FDP umgesetzt, welches dann mit der FDPase zu F-6-P gespaltet wird.

3. Der Abbau von Saccharose in Rhodopseudomonas capsulata

Saccharose ist ein Disaccharid, das aus Glucose und Fructose besteht. Die phototrophen Bakterien wurden bisher nicht auf die Verwertung dieses Zuckers überprüft. Rps.capsulata ist in der Lage, mit Saccharose als einzigem Substrat zu wachsen, während Rps.sphaeroides 17023 und 1760-1 diesen Zucker nicht verwerten. Da der Abbau von Glucose und Fructose in Rps.capsulata über zwei verschiedene Stoffwechselwege erfolgt (Kapitel 1), war es interessant, das Schicksal der Glucose und Fructose beim Abbau der Saccharose zu verfolgen. Insbesondere stellte sich die Frage, ob der Abbau der Fructose hier ebenfalls über den EM-Weg erfolgt.

3.1. Enzymatische Untersuchungen

Sowohl im Wildtyp als auch in der Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps. capsulata wurden nach phototrophem und aerobem Wachstum in Gegenwart von Saccharose die wichtigen Enzyme des Zuckerstoffwechsels untersucht (Tabelle 19).

Tabelle 19: Enzyme des Zuckerstoffwechsels des Wildtyps und der Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps.capsulata nach Anzucht auf Saccharose

Enzym	Spez. Aktivität (mE/mg) nach Wachstum auf Saccharose im		
	Wildtyp[1]		GP33[2]
	anaerob-Licht	aerob-dunkel	anaerob-Licht
Saccharase	55	68	66
Glucokinase	197	238	243
Fructokinase	6	6	21
Phosphoglucose-isomerase	443	886	
G-6-P-DH NADP	148	268	n.n.[3]
6PG-DH NADP	n.n.	n.n.	
NAD	n.n.	n.n.	
6PG-Dehydratase	140	228	
KDPG-Aldolase	134	179	
PEP-Fructose-PTS	1,5[4]	2,1[4]	
1-PFK	10	15	8
6-PFK		3	
FDP-Aldolase	42	40	
FDPase	21	10	

1) Das Mineralmedium enthielt Thiamin (0,1 mg/l).

2) Um der Mutante Wachstum zu ermöglichen, enthielt das Mineralmedium 0,1% Pepton + 0,1% Hefeextrakt.

3) n.n. = nicht nachweisbar

4) Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wie bei Tabelle 5.

Der Saccharoseabbau wird meist durch die Spaltung des Disaccharids mit Hilfe einer Saccharase eingeleitet. Dieses Enzym wurde bei Aerobacter aerogenes (Kelker et al.1970) im neutralen Bereich gemessen. Eine bei pH 7,6 aktive Saccharase wurde auch im Wildtyp und der Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps.capsulata nachgewiesen. Die Saccharase war in diesem Bakterium konstitutiv vorhanden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Aktivität der Saccharase aus Wildtyp und Glucose$^-$-Mutante GP33 von Rps.capsulata nach Anzucht auf Malat, Glucose, Fructose und Saccharose

Wachstumssubstrat[1)]	Spez. Aktivität (mE/mg) der Saccharase aus		
	Wildtyp		GP33
	anaerob-Licht	aerob-dunkel	anaerob-Licht
Malat	44	58	
Glucose	37	35	33[2)]
Fructose	46	41	43
Saccharose	55	68	66[2)]

1) Die Mineralnährlösung enthielt Thiamin (0,1 mg/l).

2) Um der Mutante Wachstum zu ermöglichen, enthielt das Mineralmedium 0,1% Pepton + 0,1% Hefeextrakt.

Nach dem Nachweis der Saccharase engte sich die Frage nach dem Abbauweg der Saccharose auf den Abbau ihrer beiden Komponenten Glucose und Fructose ein. Auf Saccharose gewachsene Wildtypzellen enthielten alle Enzyme des ED-Weges. Demgegenüber waren die Schlüsselenzyme des EM-Weges (PEP-Fructose-PTS, 1-PFK) nur in geringer spezifischer Aktivität vorhanden, die jedoch etwas höher war als in Glucosezellen. Die 6-PFK war auch in Saccharosezellen in nur sehr geringer Aktivität nachweisbar (Tabelle 1 u.5). Das Einschleusen der aus Saccharose gebildeten Glucose in den ED-Weg ist durch die hohe Aktivität der Glucokinase gewährleistet; dieses Enzym war in Rps.capsulata konstitutiv vorhanden (Tabelle 1 u.19). Die Fructokinase dagegen, mit der die aus

Saccharose gebildete Fructose in 6-Stellung phosphoryliert werden muß, um in den ED-Weg eingeschleust zu werden, war im Wildtyp in nur geringer spezifischer Aktivität zu finden; in der Mutante konnte jedoch ein etwas höheres Aktivitätsniveau gemessen werden (Tabelle 6 u.19). Aus Pseudomonas saccharophila ist noch ein weiteres Saccharose spaltendes Enzym bekannt, die Saccharosephosphorylase (Doudoroff et al.1943). Dieses Enzym spaltet Saccharose zu G-1-P + Fructose. Wie mit der Saccharase wird also auch mit diesem Enzym freie Fructose gebildet. Aus diesem Grund, und da Rps.capsulata eine leicht nachweisbare Saccharase besaß, wurde nicht geprüft, ob eine Saccharosephosphorylase vorhanden war.

Die Glucose⁻-Mutante GP33, die in der G-6-P-DH defekt ist (Tabelle 6), wuchs mit Saccharose als einzigem Substrat nicht (Abb.6); auch in Gegenwart von Saccharose wurde die G-6-P-DH nicht gebildet (Tabelle 19). Die Fuktionsunfähigkeit des ED-Weges verhinderte also offensichtlich das Wachstum mit Saccharose. Daraus ist aber nicht unbedingt zu schließen, daß die aus Saccharose gebildete Glucose und Fructose beide über den ED-Weg abgebaut werden. Eine Mutante von Aerobacter aerogenes nämlich, die defekt in der 1-PFK und der Fructokinase war, konnte infolge intrazellulärer Anhäufung von F-1-P nicht mit Saccharose wachsen, obwohl der Abbau des Glucoseteils der Saccharose durch die Mutation nicht blockiert war (Kelker et al.1970). Eine durch einen Mutationsblock verursachte Anhäufung eines Metaboliten kann also möglicherweise neben dem blockierten Abbauweg auch die Benutzung eines weiteren Abbauweges verhindern. Mit den folgenden Versuchen werden aber weitere Hinweise dafür erbracht werden, daß in Rps. capsulata der Fructoseteil der Saccharose nicht über einen anderen Weg abgebaut wird als der Glucoseteil.

3.2. Lokalisierung der Saccharaseaktivität in der Zelle

Die Tatsache, daß extrazelluläre Fructose offensichtlich nicht über den ED-Weg, sondern über den EM-Weg abgebaut wird (Kapitel 1), und daß in Saccharosezellen nur eine relativ geringe Fructokinaseaktivität nachgewiesen werden konnte, machte es notwendig, der Frage nachzugehen, ob die bei der Saccharosespaltung freiwerdende

Fructose ins Medium ausgeschieden wird; dabei könnte die Glucosekomponente unmittelbar umgesetzt werden. Bei Rhodotorula glutinis wurde beispielsweise gezeigt, daß der Glucoseteil der Saccharose schneller verbraucht wird als der Fructoseteil (Janda und Hedenström 1974). Ein Wachstumsversuch mit Rps.capsulata unter phototrophen Bedingungen mit Saccharose (Abb.23) ergab jedoch, daß trotz Saccharoseverbrauchs freie Glucose oder Fructose im Medium nicht auftrat. Bei einer Fructoseausscheidung wäre auch zu erwarten gewesen, daß das PEP-Fructose-PTS und die 1-PFK von der gebildeten Fructose induziert worden wären; das war aber in nur ganz geringem Ausmaß der Fall (Tabelle 19).

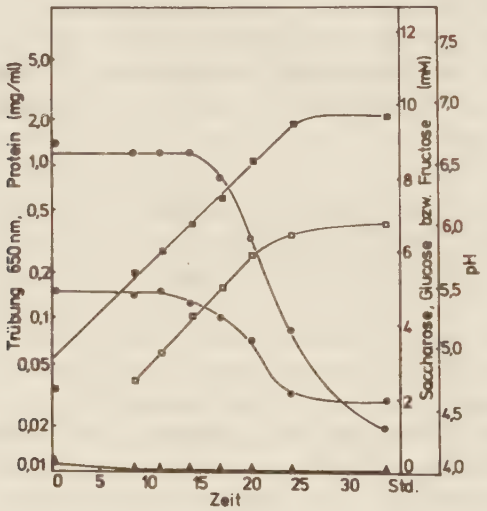


Abb.23: Phototrophes Wachstum von Rps.capsulata mit Saccharose

vergleiche Abb.8

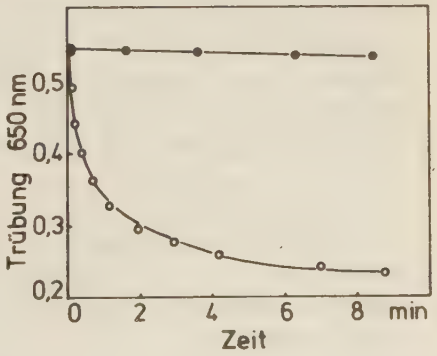
■——■ Trübung
□——□ Protein
●——● Saccharose
o——o pH-Wert
▲——▲ Glucose bzw. Fructose

Beim Wachstum mit Saccharose wurde eine Proteinausbeute gemessen, die rund 37% der eingesetzten Saccharose betrug. Dieser Wert war vergleichbar mit dem Wert bei Glucose und Fructosewachstum (Abb. 8 u.10). Es konnte also ausgeschlossen werden, daß die Fructosehälfte der Saccharose als Polymer, z.B. als Laevan, festgelegt wurde (Hassid 1960).

Von Hefen und Pilzen ist bekannt, daß die Invertaseaktivität mindestens zum Teil außerhalb der Zellmembran lokalisiert ist (Sutton und Lampen 1962, Metzenberg 1963). Auch bei Bakterien ist die Lokalisation von Enzymen im periplasmatischen Raum bekannt (Neu und Heppel 1965, Bell et al.1974). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Saccharase von Rps.capsulata im periplasmatischen Raum lokalisiert ist. Die dort freiwerdende Fructose könnte dann über das PTS in die Zelle transportiert und über den EM-Weg abgebaut werden. Es wurden deshalb mit Hilfe von Lysozym Protoplasten hergestellt; diese waren in Gegenwart von 1 M Mannit stabil (Abb. 24). Der Überstand der Protoplasten nach Lyse der Zellwand sollte die periplasmatischen Enzyme enthalten. Tabelle 21 zeigt die prozentuale Verteilung und die spezifische Aktivität der Saccharase zusammen mit anderen Enzymen in der cytoplasmatischen und

Abb.24: Stabilität von Protoplasten aus Rps.capsulata

Aerob mit Saccharose gewachsene Zellen von Rps.capsulata wurden in 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6 , 1 M Mannit, 50 mM $MgSO_4$ mit Lysozym/EDTA lysiert (Methoden 12). Die resultierende Protoplastensuspension wurde 1:10 verdünnt und die Trübungsabnahme verfolgt.



Verdünnung mit:

o——o 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6

●——● 50 mM KPO_4-Puffer pH 7,6 , 1 M Mannit, 50 mM $MgSO_4$

Tabelle 21: Lokalisierung der Saccharaseaktivität in Zellen von Rps.capsulata

Enzym	Verteilung (%) der Aktivität bzw. des Proteins auf die		Spez. Aktivität (mE/mg) in	
	cytoplasmatische Fraktion	periplasmatische Fraktion	cytoplasmatische Fraktion	periplasmatische Fraktion
Saccharase	70	30	43	6
Glucokinase	81	19	145	12
Fructokinase	77	23	11	1
G-6-P-DH NADP	89	11	297	13
Protein	25	75		

Details der Fraktionierung siehe Methoden 12.
Aerob mit Saccharose gewachsene Zellen wurden in hypertonischem Puffer (1 M Mannit) mit Hilfe von Lysozym lysiert. Die so entstandenen Protoplasten wurden abzentrifugiert (Überstand = periplasmatische Fraktion), in hypotonischem Puffer aufgenommen und somit lysiert. Die Membranen wurden abzentrifugiert (Überstand = cytoplasmatische Fraktion).

der periplasmatischen Fraktion. Daraus ist abzulesen, daß das Enzym Saccharase im Cytoplasma lokalisiert war. Die spezifische Aktivität der Saccharase in der periplasmatischen Fraktion war sehr gering und lag in der Größenordnung der zur Kontrolle geprüften cytoplasmatischen Enzyme; diese geringe Aktivität ist wohl auf die vorzeitige Lyse einzelner Protoplasten zurückzuführen.

Die geschilderten Versuche besagen: Die Saccharose wird im Cytoplasma gespaltet. Die Spaltprodukte Glucose und Fructose werden nicht ins Medium ausgeschieden und müssen demnach im Cytoplasma abgebaut werden.

3.3. Assimilation von Glucose und Fructose in Saccharosezellen

Da in Saccharosezellen leicht erhöhte Aktivitäten des PEP-Fructose-PTS und der 1-PFK gemessen wurden, muß nun auf die Ursache dieser erhöhten Aktivitäten eingegangen werden. Am wahrscheinlichsten ist es, daß die bei der Saccharosespaltung intrazellulär freiwerdende Fructose diese geringe Induktion hervorgerufen hat. Dann muß aber die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die freiwerdende Fructose auch ohne Transportvorgang vom PTS intrazellulär phosphoryliert und anschließend über den EM-Weg abgebaut werden kann. Der mögliche Umfang eines solchen Abbaus müßte sich in der Fähigkeit der Saccharosezellen wiederspiegeln, extrazelluläre Fructose zu assimilieren. Abb.25 zeigt jedoch, daß Saccharosezellen, die in Gegenwart von Chloramphenicol keine Enzyme synthetisieren konnten, Fructose kaum besser assimilierten als Glucosezellen. Das niedrige Niveau des PEP-Fructose-PTS und der 1-PFK in Saccharosezellen war anscheinend nicht ausreichend, eine Umsetzung von Fructose zu ermöglichen. Demnach ist es unwahrscheinlich, daß die aus Saccharose freigesetzte Fructose über den EM-Weg abgebaut wird, und es muß angenommen werden, daß beide Komponenten der Saccharose, sowohl die Glucose- als auch die Fructosekomponente, über den ED-Weg abgebaut werden. Dies ist in vollem Einklang mit dem Befund, daß die G-6-P-DH$^-$-Mutante von Rps.capsulata nicht mit Saccharose wachsen kann.

Im Gegensatz zu extrazellulärer Fructose wurde extrazelluläre Glucose von Saccharosezellen relativ gut assimiliert; die Rate der Glucoseassimilation war in Saccharosezellen deutlich höher als in Fructosezellen (Abb.26). Da auch Fructosezellen die Enzyme des ED-Weges besitzen (Tabelle 1), hat die aus Saccharose intrazellulär freigesetzte Glucose anscheinend zusätzlich das Glucosetransportsystem induziert; der Glucosetransport stellte nun offenbar den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Umsetzung der extrazellulären Glucose dar.

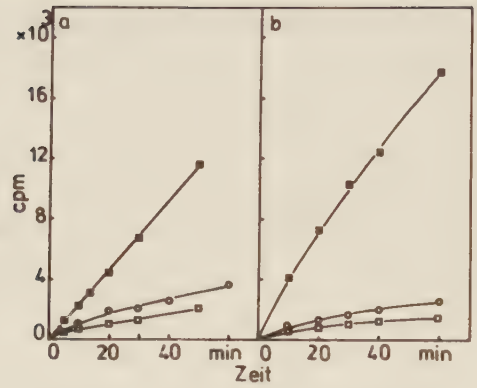


Abb.25: Assimilation von U-^{14}C-Fructose

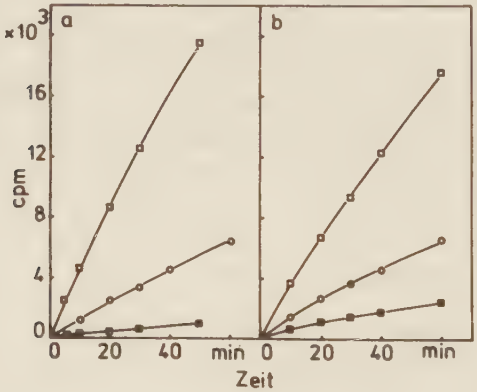


Abb.26: Assimilation von U-^{14}C-Glucose

Abb.25 u.26: Assimilation von Fructose und Glucose durch Fructose-, Glucose- und Saccharosezellen von Rps.capsulata unter phototrophen und aeroben Bedingungen in Gegenwart von Chloramphenicol

vergleiche Abb.5
Der Ansatz enthielt: 2 ml Zellsuspension, E_{650}=1,5 , in Mineralnährlösung mit Thiamin, 100 µg Chloramphenicol, 2 µmole U-^{14}C-Fructose bzw. -Glucose (0,3 µCi/µmol).
phototrophe Bedingungen (a) und aerobe Bedingungen (b)

■——■ Fructosezellen (Proteingehalt(mg/ml): 0,41(a) u. 0,53(b))
□——□ Glucosezellen (" : 0,30(a) u. 0,39(b))
o——o Saccharosezellen(" : 0,34(a) u. 0,55(b))

Die Untersuchung des Saccharosestoffwechsels von Rps.capsulata ergab also, daß extrazelluläre Fructose und intrazelluläre Fructose über verschiedene Wege abgebaut werden: extrazelluläre Fructose über den EM-Weg und intrazelluläre Fructose über den ED-Weg. Extrazelluläre und intrazelluläre Glucose werden dagegen beide über den ED-Weg abgebaut.

4. Die Regulation des Glucose- und Fructosestoffwechsels in Rhodopseudomonas capsulata

In Kapitel 1 konnte gezeigt werden, daß Glucose und Fructose in Rps.capsulata über zwei verschiedene Wege abgebaut werden. Es war demnach zu erwarten, daß die Umsetzung dieser beiden Hexosen reguliert wird, wenn sie als Substrate gleichzeitig zur Verfügung stehen. In der Regel wird dasjenige Substrat als zweites abgebaut, dessen Stoffwechselweg erst induziert werden muß. Diese Induktion aber kann durch das bevorzugte Substrat reprimiert werden; es kommt zu einem diauxischen Wachstum.

4.1. Diauxie mit Glucose und Fructose als Wachstumssubstrat

Zur Prüfung auf Diauxie wurden mit Rps.capsulata unter phototrophen Bedingungen Wachstumsversuche durchgeführt: Hierzu wurden Zellen, die mit Malat, Glucose, Fructose oder Saccharose gewachsen waren, in ein Medium geimpft, das Glucose und Fructose in einem Mischungsverhältnis von 2:1 bzw. 1:2 enthielt. Daneben wurden Kontrollen gemacht, bei denen das Medium entweder nur Glucose oder nur Fructose in der jeweiligen Konzentration enthielt. Es zeigte sich, daß Fructose immer bevorzugt vor Glucose zum Wachstum benutzt wurde. Der Diauxieknick in der Wachstumskurve trat jedoch etwas später auf, als es entsprechend der eingesetzten Fructosekonzentration zu erwarten gewesen wäre.

Deshalb wurden die Versuche wiederholt, wobei diesmal auch der Substratverbrauch gemessen wurde (Abb.27-29). Man erkennt, daß der Knick in der Wachstumskurve immer dann auftrat, wenn die Fructose verbraucht war. Andererseits wurde auch die Glucose bereits teilweise verbraucht, wenn Fructose noch im Medium vorhanden war. Das erklärt,warum der Trübungszuwachs mit der Substratkonzentration nicht in einem stöchiometrischen Zusammenhang stand. Eine stöchiometrische Diauxie wäre auch nur zu erwarten, wenn die Adaptation an das weniger bevorzugte Substrat in Gegenwart des bevorzugten vollständig verhindert würde.

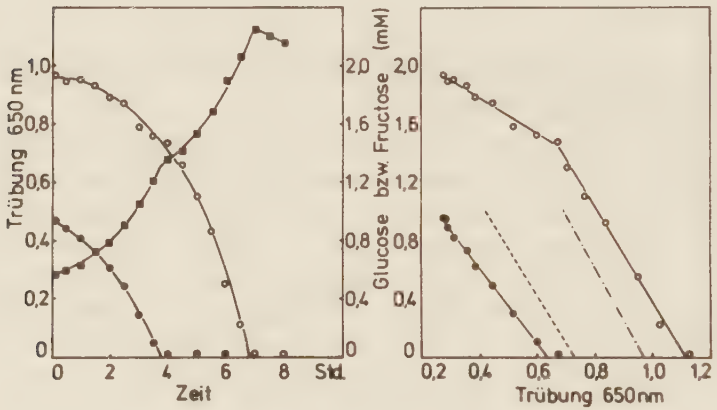


Abb.27: Verwertung von Fructose und Glucose durch Fructosezellen von Rps.capsulata unter phototrophen Bedingungen

Eine 250 ml-Sovirellflasche mit Begasungsaufsatz enthielt 200 ml Mineralnährlösung (20 mM Phosphat) mit Thiamin, Glucose und Fructose. Es wurde mit 5 ml einer Zellsuspension beimpft und bei 3000-4000 Lux anaerob, unter einer N_2-Atmosphäre bebrütet. Das Impfgut bestand aus phototroph mit Fructose gewachsenen Zellen, die in der log-Phase geerntet und in Mineralnährlösung suspendiert worden waren.

■—■ Trübung
o—o Glucose
●—● Fructose

----- Fructoseabnahme in einer Kontrollkultur von Fructosezellen mit Fructose allein

-·-·- Glucoseabnahme in einer Kontrollkultur von Glucosezellen mit Glucose allein

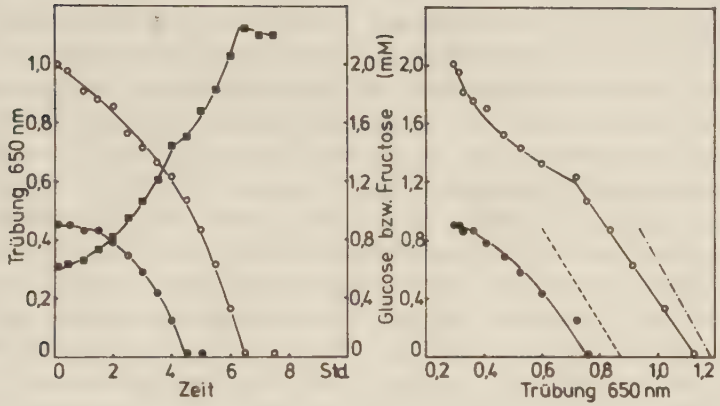


Abb.28: Verwertung von Fructose und Glucose durch Glucosezellen von Rps.capsulata unter phototrophen Bedingungen

vergleiche Abb.27

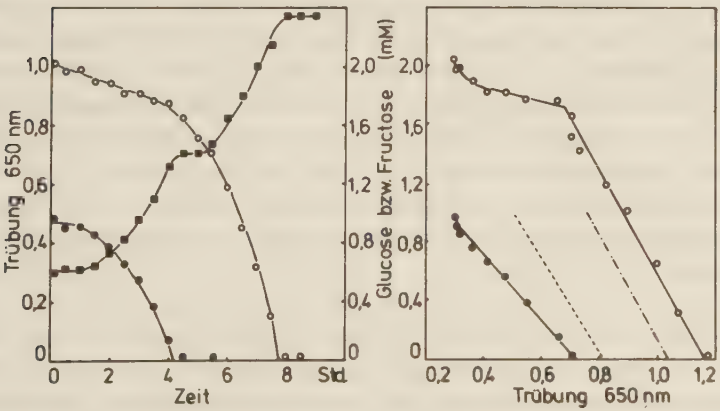


Abb.29: Verwertung von Fructose und Glucose durch Malatzellen von Rps.capsulata unter phototrophen Bedingungen

vergleiche Abb.27

Eine vollständige Unterdrückung der Adaptation war aber bei Rps. capsulata nicht zu beobachten. In jedem Fall wurde Glucose bereits verwertet, obwohl Fructose noch nicht verbraucht war (Abb. 27-29). Der Glucoseverbrauch pro Trübungszuwachs war linear, erfolgte aber in geringerem Ausmaß, als nach Verbrauch der Fructose oder in einer Kontrollkultur mit Glucose allein. Fructose unterdrückte also unabhängig von der Anzucht der Zellen den Verbrauch der Glucose. Diese Hemmung war jedoch nicht auf die bloße Anwesenheit der Fructose zurückzuführen, sondern war offensichtlich mit der Umsetzung der Fructose verbunden (Abb.28). Es stellte sich nun die Frage, welcher Regulationsmechanismus diese Hemmung in Rps.capsulata bewirkte. Grundsätzlich besitzen Organismen hierfür zwei Möglichkeiten, nämlich die Repression der Enzymsynthese und die Hemmung des betreffenden Enzyms selbst. Man spricht von Katabolitrepression und Katabolithemmung.

Rps.capsulata besitzt bei Wachstum mit Fructose alle Enzyme des ED-Weges in relativ hoher Aktivität (Tabelle 1). Das Bakterium muß lediglich das Glucosetransportsystem induzieren (Abb.5 u.26), um auch mit Glucose wachsen zu können. Dagegen müssen Glucosezellen sowohl das PEP-Fructose-PTS als auch die 1-PFK induzieren, um mit Fructose wachsen zu können (Abb.5 u.25). Dennoch wurde Fructose als Substrat bevorzugt. Da aber die Fructose offensichtlich als "gratuitous inducer" für die Enzyme des ED-Weges fungiert, ist es unwahrscheinlich, daß sie gleichzeitig das noch fehlende Glucosetransportsystem reprimiert; denn der Transport der Glucose wäre der einzige Ansatzpunkt für eine Katabolitrepression.

Um eine solche Repression restlos ausschließen zu können, müßte die Biosynthese des Glucosetransportsystems selbst untersucht werden. Es ist aber fraglich, ob die Induktion des Transports, die nötig gewesen wäre, um den hohen Glucoseverbrauch pro Trübungszuwachs unmittelbar nach Verbrauch der Fructose (Derepression) zu erklären, während der kurzen Zeit stattfinden konnte, während der das Wachstum verzögert war (Abb.27). Bereits oben

wurde gezeigt, daß Fructosezellen nur relativ langsam adaptieren (ca.2 Std.) bis Glucose mit der Rate von Glucosezellen assimiliert werden kann (Abb.5). Die Erklärung der Hemmung des Glucoseverbrauchs in Gegenwart von Fructose mit Hilfe der Katabolitrepression befriedigt deshalb nicht.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht jedoch in der Annahme einer Katabolithemmung. Eine Substanz, die im Katabolismus der Fructose in typischer Konzentration auftritt, könnte eines der Enzyme des ED-Weges hemmen. Glucose könnte dann trotz Induktion des Glucosetransportsystems nur in dem Umfang abgebaut werden, den die Reaktion des gehemmten Enzyms als geschwindigkeitsbestimmender Schritt erlaubt. Das Ausmaß der Hemmung wäre abhängig von der Menge des zu hemmenden Enzyms und der Inhibitorkonzentration in der Zelle. Die Versuchsdaten mit Glucose- und Fructosezellen (Abb.27 u.28) lassen sich mit dieser Vorstellung voll in Einklang bringen: Während in Fructosezellen der Inhibitor bereits vorhanden war, mußte er in Glucosezellen erst im Lauf der Adaptation an Fructose angehäuft werden. Entsprechend war die Hemmung des Glucoseverbrauchs in Fructosezellen von Anfang an konstant, während sie in Glucosezellen zunahm. Nach Verbrauch der Fructose verschwand die Hemmung in kurzer Zeit und Glucose wurde in vollem Umfang abgebaut. Auch in Malatzellen wurde der Glucoseverbrauch durch Fructose gehemmt (Abb.29); die Abnahme der Glucose verlief ebenfalls linear, wurde aber stärker gehemmt als in Fructosezellen. Hierzu ist zu berücksichtigen, daß die ED-Enzyme in Malatzellen in nur geringer Aktivität vorliegen (Tabelle 1) und erst induziert werden müssen. Die Notwendigkeit dieser Induktion mochte auch der Grund dafür gewesen sein, daß das Wachstum der Malatzellen nach Verbrauch der Fructose für mehr als 30 min völlig aussetzte, während das Wachstum von Fructose- und Glucosezellen nur geringfügig unterbrochen wurde (Abb.27-29). Der zu Beginn des Wachstums der Malatzellen kurzzeitig relativ hohe Glucose- und Fructoseverbrauch bezogen auf den Trübungszuwachs ist durch die noch andauernde lag-Phase beim Trübungszuwachs zu erklären (Abb.29).

4.2. Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Um behaupten zu können, daß ein Enzym des Glucoseabbaus der Katabolithemmung unterworfen ist, muß gezeigt werden, daß dieses Enzym auch in vitro hemmbar ist. Als regulierbares Enzym des ED-Weges ist die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) erkannt worden (Blackkolb und Schlegel 1968, Ohmann et al.1970). Deshalb wurde die G-6-P-DH aus Rps.capsulata auf ihre kinetischen Eigenschaften hin untersucht.

Die G-6-P-DH wurde in einem durch Chromatographie an Sephadex G25 gereinigten Extrakt (G25-Extrakt) von phototroph mit Fructose gewachsenen Zellen untersucht. Die Substratsättigungskurve mit G-6-P ließ eine deutliche Sigmoidität erkennen (Abb.30) und die Lineweaver-Burk-Auftragung der Kurve eine Aufwärtskrümmung (Abb.31); beide Kennzeichen deuten auf ein allosterisches Enzym hin. Die Sigmoidität wurde verstärkt durch die Gegenwart von 1 mM PEP, während ATP nur einen geringen Effekt ausübte. Dies drückte sich auch in der halbmaximalen Sättigung ($s_{0,5}$) des Enzyms mit G-6-P aus, die ohne Effektor 0,17 mM, mit ATP 0,23 mM und mit PEP 0,91 mM G-6-P betrug. Wurde $MgCl_2$ aus dem Testansatz weggelassen, so war die Sigmoidität noch stärker ausgeprägt. In Abwesenheit von Mg^{++}-Ionen wirkte ATP als negativer Effektor, und die Hemmung durch PEP war stärker (Abb.30 u.31). So ergaben sich bei Abwesenheit von Mg^{++}-Ionen folgende $s_{0,5}$ für G-6-P: ohne Effektor 0,25 mM, mit ATP 1,35 mM und mit PEP 1,45 mM. Wurden die Daten in einem Hill-Diagramm aufgetragen (Abb.32), so zeigte sich, daß der Wert des Hillkoeffizienten unabhängig von der Zugabe von Mg^{++}-Ionen bei Hemmung mit PEP zwischen 2,72 - 2,91 , ohne Effektorzugabe oder mit ATP zwischen 2,13 - 2,16 lag. Das läßt den Schluß zu, daß zwischen den Substratbindungsstellen der G-6-P-DH positive kooperative Wechselwirkungen bestehen, die durch PEP anscheinend verstärkt werden.

Die G-6-P-DH ist also auch in Rps.capsulata ein regulierbares Enzym. Sowohl PEP als auch freies ATP (nicht Mg-gebunden) bewirkten eine starke Hemmung des Enzyms, und beide sind Metabolite, die im EM-Weg effektiver gebildet werden als im ED-Weg. Durch

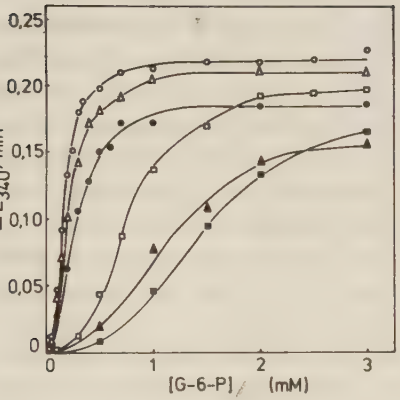


Abb.30: Substratsättigungskurven

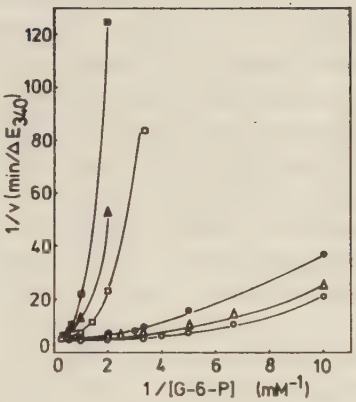


Abb.31: Lineweaver-Burk-Auftragung

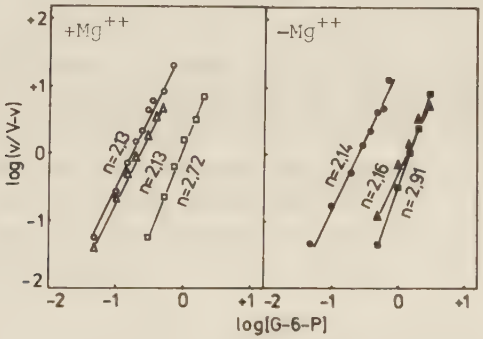


Abb.32: Hill-Diagramm

Abb.30-32: Einfluß von PEP, ATP und $MgCl_2$ auf die kinetischen Eigenschaften der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

1 ml Testansatz enthielt: 45 µmole TEA-Puffer pH 7,6 , 3,5 µmole $MgCl_2$, 0,45 µmole NADP, 350 µg Extraktprotein und G-6-P, PEP und ATP wie angegeben.

offene Symbole = mit Mg^{++} geschlossene Symbole = ohne Mg^{++}

ohne Effektor 1 mM ATP 1 mM PEP

eine höhere Poolkonzentration dieser Metabolite kann der Glucoseabbau über den ED-Weg also gehemmt werden. Jedoch wird hierbei der ATP-Pool sicher keine Rolle spielen, da die ATP-Bildung durch Substratphosphorylierung im Vergleich zur Photophosphorylierung gering ist. Mit F-1-P, dem einzigen Metaboliten, der ausschließlich beim Fructoseabbau auftritt, erfolgte keine Hemmung (Tabelle 22). Die Frage, ob die geringe Hemmung durch FDP signifikant war, konnte im G25-Extrakt auf Grund der Anwesenheit von FDP-Aldolase nicht untersucht werden. ADP und AMP waren ebenfalls schwache Inhibitoren, deren Wirkung mit der von ATP vergleichbar war. Sie hoben die Hemmwirkung von ATP und PEP nicht auf, sondern verstärkten sie im Gegenteil noch. Eine Hemmung der G-6-P-DH durch andere Metabolite, die im EM-Weg in doppelter Menge als im ED-Weg umgesetzt werden, wie z.B. GAP, DHAP, 3-Phosphoglycerat und 2-Phosphoglycerat, wurde nicht untersucht.

Tabelle 22: Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch verschiedene Effektoren bei teilweiser und vollständiger Sättigung des Enzyms mit G-6-P

Effektor (1 mM)	Hemmung (%) der G-6-P-DH bei einer Substratkonzentration von	
	0,15 mM G-6-P	1 mM G-6-P
-	0	0
ATP	24	4
ADP	26	9
AMP	22	8
ATP + ADP	44	12
ATP + AMP	27	5
PEP	97	36
PEP + ATP		51
PEP + ADP		53
PEP + AMP		43
F-1-P	0	0
F-6-P	0	2
FDP	21	8

4.3. Regulation der 1-Phosphofructokinase

Im EM-Weg werden zwar pro Mol Fructose zwei Mole PEP gebildet, jedoch wird eines davon bei der Phosphorylierung der Fructose mit dem PEP-Fructose-PTS wieder verbraucht. Dennoch sollte in der Zelle ein PEP-Überschuß entstehen, wenn Fructose und Glucose gleichzeitig abgebaut werden, da von beiden PEP gebildet wird. Eine PEP-Anhäufung führt schließlich zur Hemmung der G-6-P-DH. Es kann dann nur noch Fructose abgebaut werden, vorausgesetzt, der Fructosestoffwechsel wird nicht ebenfalls durch Katabolite gehemmt.

Die 1-Phosphofructokinase (1-PFK) ist ein Schlüsselenzym im Fructoseabbau von Rps.capsulata. An dieser Stelle könnte der Fructoseabbau reguliert werden. Daher wurden die kinetischen Eigenschaften der 1-PFK im G25-Extrakt von phototroph mit Fructose gewachsenen Zellen untersucht. Die Substratsättigungskurven mit F-1-P und ATP als Substraten (Abb.33) ließen jedoch ebenso wie die entsprechenden Lineweaver-Burk-Auftragungen (Abb.34) eine reine Michaelis-Menten-Kinetik erkennen. Aus dem Hill-Diagramm (Abb.35) errechnete sich sowohl für F-1-P als auch für ATP als Substrat ein Koeffizient von 1,06. Die 1-PFK zeigte also weder für die F-1-P- noch für die ATP-Bindungsstellen kooperative Wechselwirkungen. Die K_M-Werte für F-1-P bzw. ATP betrugen 0,028 mM bzw. 0,112 mM.

ATP wirkte in Konzentrationen über 0,4 mM hemmend, jedoch konnte dieser Effekt durch Erhöhung der Mg^{++}-Konzentration aufgehoben werden. Bei einer Konzentration von 3 mM $MgCl_2$ und 0,033 mM F-1-P hatten AMP, PEP, G-6-P und F-6-P bei einer Konzentration von 1 mM keine Wirkung auf die Aktivität der 1-PFK. Lediglich mit ADP, dem einen Endprodukt des Enzyms, war eine geringe Hemmung (ca.20%) zu beobachten. In Clostridium pasteurianum hemmt ADP kompetitiv zu ATP (Von Hugo und Gottschalk 1974b). Außerdem ist FDP, das zweite Endprodukt der Reaktion, in Clostridium pasteurianum und Aerobacter aerogenes ein nichtkompetitiver bzw. kompetitiver Inhibitor der 1-PFK (Sapico und Anderson 1969). Die Affinität der 1-PFK zu diesen Inhibitoren ist jedoch so gering, daß sie für die

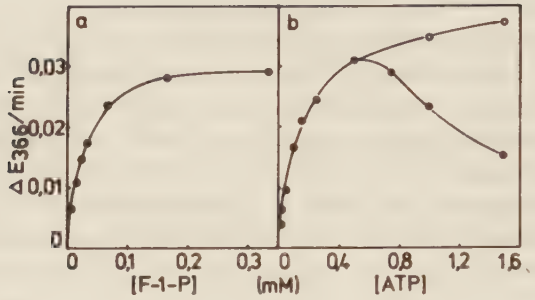


Abb.33: Substratsättigungskurven

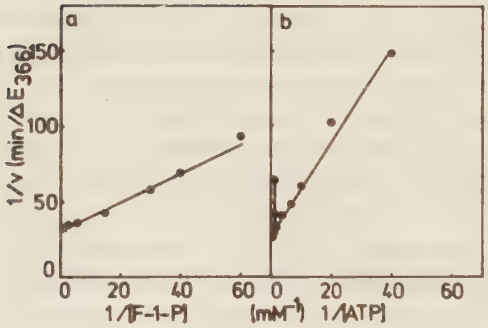


Abb.34: Lineweaver-Burk-Auftragung

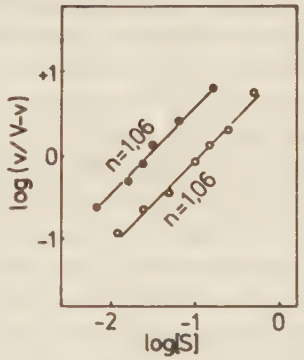


Abb.35: Hill-Diagramm

Abb.33-35: Kinetische Eigenschaften der 1-Phosphofructokinase

1 ml Testansatz enthielt: 39 µmole TEA-Puffer pH 8, 1 bzw. 3 µmole $MgCl_2$, 6,65 µmole Glutathion, 0,25 µmole NADH, 20 µg Aldolase, 40 µg GDH/TIM, ca. 140 µg Extraktprotein, 0,75 µmole ATP, 0,33 µmole F-1-P bzw. ATP und F-1-P wie angegeben.

Symbole zu Abb.33 u.34:

a) Substratsättigung mit F-1-P, ATP-Konzentration = 0,75 mM

b) Substratsättigung mit ATP, F-1-P-Konzentration = 0,33 mM

●——● 1 mM $MgCl_2$

o——o 3 mM $MgCl_2$

Symbole zu Abb.35:

●——● S = F-1-P

o——o S = ATP

Regulation des Enzyms in diesen Organismen wohl keine Rolle spielen. Da die 1-PFK von Rps.capsulata nur im ungereinigten Zustand untersucht wurde, konnte der Einfluß von ADP und FDP auf die Enzymaktivität nicht überprüft werden. Bei der Regulation des Hexosestoffwechsels von Rps.capsulata spielt die 1-PFK jedoch anscheinend keine Rolle.

Zusammenfassend läßt sich über die Regulation des Glucose- und Fructosestoffwechsels von Rps.capsulata folgendes aussagen: Fructose wird gegenüber Glucose bevorzugt abgebaut. Die Verwertung von Glucose wird gehemmt, solange Fructose umgesetzt wird; diese Hemmung ist nicht vollständig. Die G-6-P-DH, das Schlüsselenzym des Glucosestoffwechsels, wird durch PEP, das gemeinsame Produkt des Glucose- und Fructosestoffwechsels, gehemmt. Die 1-PFK, das Schlüsselenzym des Fructosestoffwechsels, wird nicht gehemmt.

DISKUSSION

1. Der Abbau von Glucose und Fructose in Rhodopseudomonas capsulata und Rhodopseudomonas sphaeroides

Glucose und Fructose können je nach Art des Organismus verschiedenen Bedürfnissen dienen. So können sie als Energie-, Kohlenstoff oder Elektronenquelle fungieren. In jedem Fall aber müssen diese Hexosen zunächst in den zentralen, amphibolischen Stoffwechsel eingeschleust werden. Der EM-, ED- und PP-Weg stellen bei Mikroorganismen in der Regel die Wege dar, auf denen die genannten Zucker in den Intermediärstoffwechsel einmünden. Hierbei können in einigen Mikroorganismen Modifikationen auftreten, die entweder bereits die C_6-Körper betreffen, wie beim Abbau über 2-Keto-3-deoxygluconat,z.B. in Rps.sphaeroides (Szymona und Doudoroff 1960) und in Clostridien (Andreesen und Gottschalk 1969, Bender et al.1971) und über 2-Ketogluconat,z.B. in Aerobacter cloacae (De Ley 1954), in Pseudomonas putida (Vincente und Canovas 1973a,b) und in Ps.aeruginosa (Roberts et al.1973), oder die C_3-Körper betreffen, wie beim Abbau über Methylglyoxal,z.B. in Escherichia coli (Cooper und Anderson 1970) und in Ps.saccharophila (Cooper 1974). Bislang stellen solche Modifikationen Ausnahmen dar.

Ein Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß Rps.capsulata Glucose über den ED-Weg und Fructose über den EM-Weg abbaut. In anderen Bakterien werden die beiden Hexosen in der Regel gemeinsam über nur einen der beiden Wege abgebaut. Es stellt sich nun die Frage, wie die Zelle Fructose und Glucose getrennt in den EM- bzw. ED-Weg einschleusen kann, ohne daß ihre C_6-Körper miteinander äquilibrieren. Eine Möglichkeit wäre Zellkompartimentierung, d.h. die Enzyme der beiden Abbauwege sind in verschiedenen Bezirken innerhalb der Zelle lokalisiert. Eine weitere Möglichkeit würde darin bestehen, daß die Enzyme des jeweiligen Abbauweges nur von der in diesem Weg abzubauenden Hexose induziert werden. Diese Möglichkeit ist z.B. in E.coli beim Gluconatabbau über den ED-Weg verwirklicht (Eisenberg und Dobrogosz 1967): Gluconat induziert die 6PG-Dehydratase; Glucose dagegen induziert

das Enzym nicht und wird deshalb nicht über den ED-Weg, sondern über den EM-Weg abgebaut.

Stellt man sich nun aber vor, daß Glucose bzw. Fructose in die Zelle aufgenommen und dort zu G-6-P bzw. F-6-P umgewandelt worden ist, so würden die beiden Hexosephosphate bei ausreichender Phosphoglucoseisomerase(PGI)-Aktivität ineinander umwandelbar sein. Es wäre keine Möglichkeit zu sehen, wie Glucose und Fructose über verschiedene Wege abgebaut werden sollten, ohne daß die PGI-Aktivität streng reguliert würde; denn der ED- und PP-Weg beginnen mit G-6-P und der EM-Weg beginnt mit F-6-P. Eine kompetitive Hemmung von Säugetier-PGI durch 6PG ist zwar bekannt geworden (Parr 1956, Kahana et al.1960), aber die Äquilibrierung von G-6-P und F-6-P ist in vivo anscheinend dennoch ausreichend (Landau und Katz 1964). Intrazellulär vorliegende Glucose und Fructose werden in Mikroorganismen immer in 6-Stellung phosphoryliert. In Rattenleber existiert eine Fructokinase, die intrazelluläre Fructose in 1-Stellung phosphoryliert (Adelmann et al. 1967). In Bakterien erfolgt aber eine solche Reaktion nur in Zusammenhang mit dem Transport durch das PEP-Fructose-Phosphotransferasesystem. Während hierbei Fructose in 1-Stellung phosphoryliert wird, wird durch das PEP-Glucose-PTS Glucose in 6-Stellung phosphoryliert.

In Mikroorganismen, denen ein PEP-Fructose-PTS fehlt, muß Fructose unphosphoryliert transportiert werden. Die Phosphorylierung innerhalb der Zelle hat zum Ergebnis, daß F-6-P gebildet wird. F-6-P wird dann meist über den gleichen Weg abgebaut, wie das aus Glucose gebildete G-6-P. Ein Transport der freien Hexose ohne das PTS erfolgt bei vielen obligat aeroben Bakterien (Romano et al.1970) wie Pseudomonas aeruginosa (Phibbs und Eagon 1970, Midgley und Dawes 1973), Ps.fluorescens (Eisenberg et al.1974), Azotobacter vinelandii (Barnes 1972), Thiobacillus intermedius (Romano et al.1975), Brucella abortus (Rest und Robertson 1974), und außerdem bei Pilzen (Mark und Romano 1971), Hefen (Cirillo 1968) und Protozoen (Serrano und Reeves 1974). Diese nur über einen nichtphosphorylierenden Transport der Hexosen verfügenden Orga-

nismen besitzen nur einen Abbauweg, den ED-Weg (Beteiligung des PP-Weges möglich) bei Pseudomonaden (Stern et al.1960), Azotobacter vinelandii (Still und Wang 1964) und Thiobacillus intermedius (Matin und Rittenberg 1970), den PP-Weg bei Brucella (Robertson und McCullough 1968a) und den EM-Weg (Beteiligung des PP-Weges möglich) bei Pilzen und Hefen (Wang et al.1958).

In Mikroorganismen aber, die über ein PEP-Fructose-PTS verfügen, besteht die Möglichkeit, die Abbauwege von Glucose und Fructose funktionell zu trennen: Denn durch die Bildung von F-1-P aus Fructose auf der einen und von G-6-P aus Glucose auf der anderen Seite wird eine Äquilibrierung der Hexosephosphate verhindert. Der weitere Abbau von F-1-P kann dann über den EM-Weg mit 1-Phosphofructokinase als Schlüsselenzym erfolgen, während G-6-P bei Vorhandensein eines ED- oder PP-Weges über diese abgebaut werden kann. Bisher wurde aber noch kein Bakterium mit diesen beiden Abbauwegen beschrieben. Alle Bakterien, die ein PEP-Fructose-PTS und eine 1-PFK besitzen, verfügen entweder nicht über sämtliche Enzyme (G-6-P-DH, 6PG-Dehydratase, KDPG-Aldolase), die für das Funktionieren des ED-Weges nötig sind, oder induzieren diese nur in Gegenwart von Gluconat. Im einzelnen sind dies: Aerobacter aerogenes (Hanson und Anderson 1966 u.1968, Sapico et al.1963), Escherichia coli (Fraenkel 1968b, Ferenci und Kornberg 1971a u. 1973), Bacillus subtilis (Gay und Rapoport 1970), Arthrobacter pyridinolis (Sobel und Krulwich 1973), Clostridien (Patni und Alexander 1971a,b, Von Hugo und Gottschalk 1974a), Beneckea- bzw. Photobacteriumarten (Gee et al.1975) und Pseudomonas doudoroffii (Baumann und Baumann 1975a). Alle diese Organismen bauen Fructose mit Hilfe des EM-Weges über F-1-P ab; Glucose aber wird ebenfalls über den EM-Weg abgebaut, wenngleich bei diesem Substrat die 6-PFK das Schlüsselenzym ist. Daneben kann Glucose zum Teil auch über den PP-Weg abgebaut werden (Wang et al.1958), aber es erfolgt kein Abbau über den ED-Weg.

Auf der anderen Seite benutzen Bakterien, die den ED-Weg besitzen, diesen auch für den Fructoseabbau, wie z.B. Pseudomonas saccharophila (De Ley 1960), Alcaligenes eutrophus (Gottschalk et al.

1964), Zymomonas anaerobica (McGill und Dawes 1971) und Nocardia opaca (Probst und Schlegel 1973). Pseudomonas putida baut Glucose über eine modifizierte Form des ED-Weges ab, nämlich über 2-Ketogluconat (Vincente und Canovas 1973a,b). Fructose kann von 6PG-Dehydratase$^-$-Mutanten dieses Bakteriums noch umgesetzt werden, während Glucose nicht verwertet werden kann (Vincente und Canovas 1973b). Der Weg des Fructoseabbaus in Ps.putida ist somit noch ungeklärt; die Autoren vermuten, daß Fructose auf Grund eines noch unbekannten Regelmechanismus in den PP-Weg eingeschleust wird.

Bei Purpurbakterien wurde in Rps.sphaeroides (Szymona und Doudoroff 1960) und Rps.capsulata (Eidels und Preiss 1970) der ED-Weg nachgewiesen; es wurde angenommen, daß sowohl Glucose als auch Fructose über diesen Weg abgebaut werden. Von Saier et al.(1971) konnte aber gezeigt werden, daß phototrophe Bakterien ein PEP-Fructose-PTS besitzen, das Fructose in 1-Stellung phosphoryliert. Hiermit ist aber die Möglichkeit gegeben, daß Glucose einerseits über den ED-Weg und Fructose andererseits über den EM-Weg abgebaut wird.

Um zu zeigen, daß ein bestimmter Stoffwechselweg beschritten wird, prüft man in der Regel zunächst die Enzyme dieses und die der alternativen Stoffwechselwege, wobei man erwartet, daß die einen Enzyme vorhanden sind und die anderen nicht. In Rps.capsulata und Rps.sphaeroides sind alle Enzyme des ED- und EM-Weges vorhanden. Da die Schlüsselenzyme des EM-Weges nur mit Fructose induziert werden, erscheint es plausibel, daß Fructose auch tatsächlich über diesen Weg abgebaut wird. Der EM-Weg liegt dabei in der modifizierten Form vor, in der Fructose über F-1-P mit Hilfe der 1-PFK abgebaut wird. Eine 6-PFK ist nur in geringer Aktivität zu finden, so daß Hexose-6-phosphate nicht über den EM-Weg umgesetzt werden können. Aus diesem Grund steht für den Abbau der Glucose nur der ED-Weg zur Verfügung. Die in vielen Organismen demonstrierte Beteiligung des PP-Weges läßt sich ausschließen, da das Schlüsselenzym 6PG-DH nicht vorhanden ist.

Einen sicheren Beweis aber können enzymatische Untersuchungen allein nicht erbringen, vor allem wenn sich die Entscheidung auf das Fehlen von Enzymen gründet. Der Befund, daß sich ein Enzym in vitro nicht nachweisen läßt, besagt noch nicht, daß das Enzym in vivo fehlt oder funktionsuntüchtig ist. Im speziellen Fall von Rps.capsulata und Rps.sphaeroides bestanden demnach trotz der enzymatischen Analyse noch folgende Möglichkeiten:

1. Die 6-PFK-Aktivität reicht aus, um Glucose ebenfalls über den EM-Weg abzubauen.
2. Der PP-Weg ist am Hexoseabbau beteiligt; die in vitro nicht nachweisbare 6PG-DH ist in vivo funktionsfähig.
3. Fructose wird doch über den ED-Weg abgebaut, weil
   a) Fructose auch unphosphoryliert in die Zelle transportiert werden kann und die Fructokinaseaktivität ausreicht, um F-6-P zu bilden,
   b) F-1-P direkt in F-6-P umgewandelt werden kann,
   c) FDP durch die FDPase zu F-6-P umgesetzt wird.

Um die genannten Möglichkeiten ausschließen zu können, müssen andere Methoden der Stoffwechselanalyse herangezogen werden als die enzymatischen. Für in-vivo-Versuche boten sich radiometrische Methoden und die Mutantenanalyse an.

zu Möglichkeit 1): Die Radiorespirometrieversuche mit Glucose schließen eine Beteiligung des EM-Weges am Glucoseabbau auf Grund der $^{14}CO_2$-Ausbeute aus den einzelnen Positionen des Glucosemoleküls aus, da die Ausbeute aus C3 bzw. C4 nicht größer ist als die aus C6 bzw. C1. Außerdem vermag eine G-6-P-DH$^-$-Mutante von Rps. capsulata nicht mit Glucose zu wachsen, obwohl die Enzyme des EM-Weges (auch die 6-PFK) von der Mutation unberührt geblieben sind.

zu Möglichkeit 2): Auch die Möglichkeit, daß der PP-Weg am Abbau der Glucose oder Fructose beteiligt ist, wird durch die Radiorespirometrie stark eingeschränkt. Die $^{14}CO_2$-Ausbeute aus C1 der Glucose ist zwar etwas größer als aus C4; dies ist aber vor allem wegen der geringen Ausbeute an C2 wahrscheinlich nicht auf eine

Beteiligung des PP-Weges zurückzuführen, sondern auf die Ungleichwertigkeit der beiden C_3-Spaltprodukte des C_6-Körpers der Glucose. Bei Rps.sphaeroides sprechen besonders die radiorespirometrischen Daten über Stamm 1760-1 gegen eine wesentliche Beteiligung des PP-Weges: Obwohl hier ein Block in der 6PG-Dehydratase-Reaktion vorliegt, lassen sich die radiorespirometrischen Daten nicht mit einer Funktion des PP-Weges in Einklang bringen; vielmehr muß in diesem Stamm neben dem EM-Weg ein modifizierter ED-Weg (KDG-Weg) eine Rolle spielen. Nur in Rps.sphaeroides Stamm 17023 konnte eine 6PG-DH nachgewiesen werden, die NAD-spezifisch war. Rps.sphaeroides ähnelt somit in dreifacher Hinsicht Thiobacillus novellus (Matin und Rittenberg 1971) und Brucella abortus (Robertson und McCullough 1968a,b), nämlich: NAD-spezifische 6PG-DH, geringe FDP-Aldolase-Aktivität und hohe KDPG-Aldolase-Aktivität bei fehlender 6PG-Dehydratase. Die radiorespirometrischen Daten aber sind bei diesen Organismen ganz anders; Glucose wird dort nur über den PP-Weg + Tricarbonsäurecyclus abgebaut.

zu Möglichkeit 3): Die Möglichkeit, daß der ED-Weg am Fructoseabbau in nennenswerter Weise beteiligt ist, läßt sich auf Grund der Ergebnisse von Mutantenanalyse und Radiorespirometrie für Rps.capsulata ausschließen. Rps.sphaeroides dagegen baut Fructose unter aeroben Bedingungen zum größten Teil über den ED-Weg ab. Rps.sphaeroides besitzt konstitutiv eine Fructokinase. Wenn Fructose unphosphoryliert in die Zelle gelangen würde, wäre der Abbau über den ED-Weg verständlich.

FDPase$^-$-Mutanten von Aerobacter aerogenes wachsen nicht mit Fructose (Sapico et al.1968). Fructose ist also in diesem Bakterium durch seinen ausschließlichen Abbau über F-1-P ein gluconeogenetisches Substrat, d.h. Hexose-6-phosphate können nur aus FDP gebildet werden. Fructose kann somit in diesem Bakterium weder unphosphoryliert in die Zelle transportiert werden, noch kann F-1-P direkt zu F-6-P umgewandelt werden. In Escherichia coli dagegen können FDPase$^-$-Mutanten gut mit Fructose wachsen (Fraenkel 1968b). Die Ursache hierfür liegt anscheinend in der Fähigkeit des PEP-Fructose-PTS begründet, bei höheren Fructosekonzentrationen (2 mM) nicht nur F-1-P, sondern auch F-6-P zu bilden (Kornberg 1972,

Ferenci und Kornberg 1971b). Auch in E.coli kann F-1-P nicht direkt zu F-6-P umgewandelt werden: Während der Wildtyp nach Induktion des F-1-P-Transports mit Hexose-6-P einige Generationen mit F-1-P wachsen kann (Ferenci et al.1971), vermag eine FDPase$^-$-Mutante dies nicht (Ferenci und Kornberg 1971b). In Arthrobacter pyridinolis schließlich konnte neben dem PEP-Fructose-PTS noch ein zweites Fructosetransportsystem nachgewiesen werden (Wolfson et al.1974), das Fructose unphosphoryliert in die Zelle transportiert und mit der Oxidation von Malat energetisch gekoppelt ist.

Für Rps.sphaeroides muß die Frage, wie Fructose in den ED-Weg eingeschleust wird, unbeantwortet bleiben. Fructose könnte unphosphoryliert transportiert und mit der Fructokinase phosphoryliert werden, oder Fructose wird über einen Umweg zuerst zu FDP umgesetzt, das dann zu F-6-P umgewandelt wird. Eine Mutasereaktion, bei der F-1-P zu F-6-P umgesetzt wird, erscheint unwahrscheinlich und konnte im zellfreien Extrakt auch nicht gefunden werden. Eine Phosphorylierung der Fructose durch das PTS in 6-Stellung kann zumindest für die hier verwendeten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden, denn der Test des PEP-Fructose-PTS (Saier et al.1971) ergibt bei derselben Fructosekonzentration (2-2,5 mM) F-1-P als Reaktionsprodukt, bei der auch die Radiorespirometrieversuche durchgeführt wurden.

Obwohl in Rps.sphaeroides bei Fructosewachstum die 1-PFK induziert wird, erfolgt der Abbau aerob über den ED-Weg. Die Ursache ist offensichtlich eine bei aerobem Wachstum zu geringe FDP-Aldolase-Aktivität. Anaerob im Licht gewachsene Zellen besitzen jedoch eine höhere Aktivität (Willard et al.1965) und gleichzeitig erfolgt auch der Fructoseabbau anscheinend über den EM-Weg. Rps.sphaeroides enthält wie wohl die meisten Bakterien eine nach der Nomenklatur von Lebherz und Rutter (1969) metallabhängige Klasse-II-Aldolase, die durch Fe^{++}-Ionen aktiviert wird (Willard et al.1965). Aber auch die Klasse-I-Aldolase wurde in Bakterien nachgewiesen (Lebherz und Rutter 1973), und Escherichia coli besitzt sogar beide Aldolase-Klassen, wenn er auf C_3-Verbindungen

statt auf Glucose gezogen wird (Stribling und Perham 1973). Auch Grünalgen verfügen über beide Aldolase-Klassen; die metallabhängige Klasse-II-Aldolase wird aber nur unter heterotrophen Bedingungen gebildet, z.B. in Chlamydomonas mundana (Russell und Gibbs 1966), Ch.reinhardii (Guerrini et al.1971) und Euglena gracilis (Mo et al.1973), und es wurde deshalb angenommen, daß diese Aldolase eher glycolytische Funktionen besitzt, während die Klasse-I-Aldolase unter photoautotrophen Bedingungen dominiert. Auch in Rps.sphaeroides ist die Bildung der FDP-Aldolase anscheinend von den Kulturbedingungen abhängig.

Rps.sphaeroides baut Fructose unter phototrophen Bedingungen wahrscheinlich hauptsächlich über den EM-Weg ab, während unter aeroben Bedingungen der Abbau über den ED-Weg erfolgt, und der EM-Weg nur zu einem geringen Maß beteiligt ist. Ein Einfluß der Kulturbedingungen auf den Anteil des PP-Weges am Abbau der Glucose mit EM- oder ED-Weg als Hauptabbauweg wurde mehrfach beschrieben. So wird der Anteil beeinflußt von der Zusammensetzung des Mediums (Wang und Krackov 1962), von der Temperatur (Palumbo und Witlev 1969), vom O_2-Partialdruck und pH-Wert (Blumenthal et al. 1974) und vom Zustand der Zelldifferenzierung (Lynch und Henny 1973, Orlowski und Goldmann 1975, Dawson und Westlake 1975). Dabei kommt der 6PG-DH als regulierbares Enzym des PP-Weges zumindest bei Streptococcus faecalis besondere Bedeutung zu (Brown und Wittenberger 1971). Eine gleichzeitige Beteiligung von EM- und ED-Weg am Abbau einer Hexose wurde bisher noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen. Aquaspirillum gracile verfügt nicht nur über die Enzyme des ED-Weges sondern außerdem auch über 6-PFK und FDP-Aldolase (Laughon und Krieg 1974). Glucosezellen von Bacillus larvae enthalten sämtliche Enzyme, die für das Funktionieren von EM-, ED- und PP-Weg nötig sind (Julian und Bulla 1971); Radiorespirometrieversuche ließen aber erkennen, daß Glucose offensichtlich über einen oxidativen Weg unter Rezyklisierung abgebaut wird, und daß dabei EM- und ED-Weg keine signifikante Rolle spielen. Microcyclus aquaticus baut auf Grund radiorespirometrischer Versuche Glucose über ED- + PP-Weg ab (Kottel und Raj 1973);

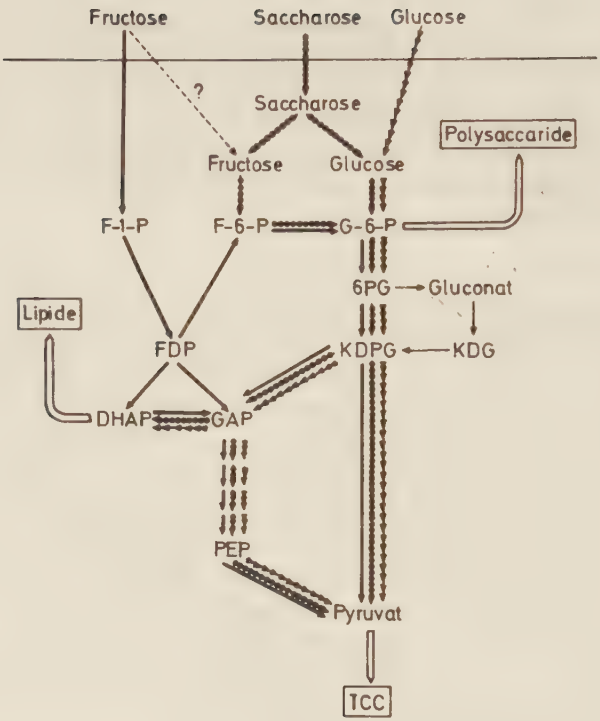


Abb.36: Schema der Abbauwege von Fructose, Glucose und Saccharose in Rps.capsulata und Rps.sphaeroides

die Möglichkeit, daß außerdem der EM-Weg am Glucoseabbau beteiligt ist, wurde von den Autoren diskutiert. Für Desulfotomaculum nigrificans liegen Gärungsanalysen mit positions-markierter Glucose vor, die auf Grund der Radioaktivitätsverteilung im Gärungsprodukt Acetat besagen, daß Glucose anscheinend nicht nur über den EM-Weg, sondern zu etwa 10% auch über den ED-Weg abgebaut wird (Akagi und Jackson 1967).

Für Rps.sphaeroides darf auf Grund der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten angenommen werden, daß Fructose unter aeroben Bedingungen gleichzeitig über den ED-Weg und den EM-Weg abgebaut wird.

Der Fluß des Kohlenstoffs beim Abbau von Glucose und Fructose in Rps.capsulata bzw. Rps.sphaeroides ist aus der Abb.36 zu ersehen.

2. Der Abbau von Saccharose in Rhodopseudomonas capsulata

Zuckerverwertung kommt bei phototrophen Bakterien relativ selten vor. Dies dürfte der Grund sein, warum bisher noch nichts über ihre Fähigkeit zur Saccharoseverwertung bekannt geworden ist. Rps.capsulata ist somit das erste phototrophe Bakterium, bei dem über Wachstum auf Saccharose berichtet wird. Bei fädigen Blaualgen dagegen ist die Fähigkeit, heterotroph mit Saccharose zu wachsen, offenbar weit verbreitet (Khoja und Whitton 1971, Miller und Allen 1972, White und Shilo 1975), während bei einzelligen Formen die Photoautotrophie die Regel zu sein scheint (Stanier et al.1971, Rippka 1972).

Saccharose wird von Bakterien von Art zu Art verschieden abgebaut. So benutzen einzelne Arten nur den Fructose- bzw. Glucoseteil des Saccharosemoleküls zum Wachstum und bilden mit der anderen Hälfte die Polysaccharide Dextran bzw. Laevan, die aus Glucose- bzw. Fructosemolekülen bestehen. Die Spaltung der Saccharose zur freien Fructose bzw. Glucose und die gleichzeitige Synthese des Dextrans bzw. Laevans wird dabei von der Dextran- bzw. Laevansucrase besorgt (Hassid 1960).

Bacillus subtilis vermag Saccharose auf zwei verschiedenen Wegen zu verwerten: Das Bakterium verfügt nämlich sowohl über eine intrazelluläre Saccharase (Prestige und Spizizen 1969) als auch über eine Laevansucrase, die ins Medium ausgeschieden wird (Pascal et al.1971). Saccharose wird also entweder extrazellulär gespaltet und anschließend lediglich die Glucosekomponente (nach Transport in die Zelle mit dem PEP-Glucose-PTS) abgebaut, oder die Saccharose wird als ganzes Molekül in die Zelle transportiert und erst dort gespaltet. Die Spaltprodukte werden dann über den EM-Weg mit 6-PFK als Schlüsselenzym abgebaut (Lepesant et al. 1972). Beim Transport der Saccharose wird das Disaccharid in der 6-Stellung der Glucosekomponente phosphoryliert; Transport und Phosphorylierung erfolgen durch ein PEP-Phosphotransferasesystem (Lepesant und Dedonder 1968, Marquet et al.1970).

Auch Staphylococcus aureus besitzt ein PTS, das Disaccharide in die Zelle transportiert und phosphoryliert, unter anderem Maltose, Lactose und Saccharose. Lactose wird durch PEP im Galactosidteil in 6-Stellung phosphoryliert; über die Stellung der Phosphatgruppe im Saccharosemolekül ist nichts bekannt (Hengstenberg et al.1968). Im Gegensatz zu diesen beiden Bakterienarten werden in Enterobacteriaceae Disaccharide anscheinend mit einem anderen System unphosphoryliert in die Zelle transportiert (Roseman 1972). Ein PEP-PTS für Disaccharide wurde außer in Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus nur noch für Lactose in Streptococcus lactis (McKay et al.1970) und für Trehalose in Bacillus popilliae (Bhumiratana et al.1974) beschrieben. Ein PEP-PTS für Disaccharide ist also bisher nur in grampositiven Bakterien gefunden worden.

In Staphylococcus aureus wird das vom PEP-PTS gebildete Lactose-phosphat nicht mit der normalen ß-Galactosidase gespaltet, sondern mit einem eigenen Enzym, das nicht mit o-Nitrophenyl-galactosid, sondern nur mit o-Nitrophenyl-galactosid-6-phosphat reagiert (Hengstenberg et al.1967). Dieses Enzym wurde außerdem in Streptococcus lactis, S.cremoris und S.diacetylactis nachgewiesen (McKay et al.1970). Auch in Bacillus popilliae wird das vom PTS gebildete Trehalosephosphat durch eine eigene Phosphotrehalase zu Glucose + G-6-P gespaltet (Bhumiratana et al.1974). In Aerobacter aerogenes werden Cellobiose und Gentiobiose zwar nicht durch ein PEP-PTS sondern durch eine ATP-abhängige Kinase phosphoryliert, aber die resultierenden Monophosphate werden auch in diesem Bakterium mit einem eigenen Enzym, der Phospho-ß-glucosidase zu Glucose + G-6-P gespaltet (Palmer und Anderson 1972a,b,c). In Bacillus subtilis aber erfolgt die Spaltung des vom PTS gebildeten Saccharosephosphats zu Fructose + G-6-P anscheinend mit der normalen Saccharase (ß-Fructosidase), die auch unphosphorylierte Saccharose hydrolysieren kann (Lepesant et al.1972).

Bei Pseudomonas saccharophila (Doudoroff et al.1943), Ps.putrefaciens und Leuconostoc mesenteroides (Weimberg und Doudoroff 1954) wurde noch ein weiterer Mechanismus zur Spaltung der Saccharose bekannt: Die Saccharosephosphorylase spaltet das Disaccharid phosphorolytisch zu Fructose + G-1-P. Das Enzym wirkt dabei als Transglucosidase (Doudoroff et al.1947).

Rps.capsulata dagegen besitzt wie Aerobacter aerogenes (Kelker et al.1970) und einige andere Bakterien (Hofmann 1935) eine Saccharase, die das Disaccharid im neutralen Bereich zu Glucose + Fructose zu spalten vermag; das Enzym aus Hefen und Pilzen dagegen ist im Sauren aktiv (Hofmann 1935, Lampen 1971). In Aerobacter aerogenes werden die durch die Saccharosespaltung entstandenen Hexosen in 6-Stellung phosphoryliert und über den EM-Weg mit 6-PFK als Schlüsselenzym abgebaut (Kelker et al.1970). In Rps. capsulata dagegen erfolgt der Abbau dieser Hexosen über den ED-Weg. Während in Aerobacter aerogenes die Saccharase nur mit Saccharose oder Fructose induziert wird, ist das Enzym in Rps.capsulata konstitutiv. Beide Organismen haben mit Saccharose als

Wachstumssubstrat eine gegenüber Glucose leicht erhöhte Aktivität der 1-PFK. Im Gegensatz zu Aerobacter, dessen Fructokinase durch Saccharose induziert wird, wurde in Rps.capsulata eine konstitutive, aber relativ geringe Aktivität gemessen. Ein Abbau der aus Saccharose gebildeten Fructose über F-1-P und den EM-Weg ließ sich aber ebenso ausschließen, wie die Benutzung der Fructosekomponente zur Laevanbildung. In Rps.capsulata wird also die intrazellulär entstehende Fructose über den ED-Weg abgebaut; die extrazelluläre Fructose wird dagegen über den EM-Weg abgebaut. In Rps.capsulata unterscheidet sich der Abbau von extrazellulärer und intrazellulärer Fructose also in den zentralen Hexoseabbauwegen (EM- bzw. ED-Weg), während er sich in Aerobacter aerogenes nur in der Modifikation des EM-Weges (über F-1-P bzw. F-6-P) unterscheidet (Kelker et al.1970).

In Rps.capsulata ist die Saccharaseaktivität im Cytoplasma lokalisiert. Bei Hefen,wie z.B. Saccharomyces cerevisiae (Sutton und Lampen 1962) und bei Pilzen,wie z.B. Neurospora crassa (Metzenberg 1963) befindet sich das Enzym dagegen zumindest teilweise außerhalb der Cytoplasmamembran im periplasmatischen Raum. Im Säugetierdünndarm ist die Saccharaseaktivität in der Membran lokalisiert, und die Spaltung der Saccharose ist anscheinend mit dem Transport der Glucosekomponente gekoppelt (Ramaswamy et al. 1974).

Der Abbauweg der Saccharose in Rps.capsulata ist aus Abb.36 zu ersehen.

3. Die Regulation des Glucose- und Fructosestoffwechsels in Rhodopseudomonas capsulata

Für den Abbau eines Substrats müssen die notwendigen Enzyme in der Zelle vorhanden sein. Es gibt konstitutive und induzierbare Enzyme. Die Enzyminduktion stellt die einfachste Möglichkeit der Regulation eines Stoffwechselweges dar: Die benötigten Enzyme werden erst dann gebildet, wenn das Substrat der Enzyme vorhanden ist. Die Enzyme eines Abbauweges können dabei koordiniert oder sequentiell induziert werden.

In Rps.capsulata erfolgt sowohl mit Fructose als auch mit Glucose eine Induktion des jeweiligen Abbauweges. Fructose induziert die Bildung des PEP-Fructose-PTS und der 1-PFK. Dieser Induktionsvorgang ist anscheinend auch in anderen Bakterien mit Fructoseabbau über F-1-P üblich, wie z.B. in Aerobacter aerogenes (Hanson und Anderson 1966), Escherichia coli (Fraenkel 1968b), Clostridium thermocellum (Patni und Alexander 1971b) und Arthrobacter pyridinolis (Sobel und Krulwich 1973).

Glucose und Fructose induzieren in Rps.capsulata die Bildung der Enzyme G-6-P-DH, 6PG-Dehydratase und KDPG-Aldolase. Da diese Enzyme für den Fructoseabbau nicht notwendig sind, wirkt Fructose als "gratuitous inducer". Da das Glucosetransportsystem aber nur von Glucose induziert wird, ist anzunehmen, daß der Induktor der G-6-P-DH ihr Substrat G-6-P ist, das auch im Fructosestoffwechsel gebildet werden kann. Die 6PG-Dehydratase wird möglicherweise ebenfalls von ihrem Substrat 6PG induziert, da dieses Enzym in einer G-6-P-DH$^-$-Mutante nur in geringer Aktivität vorhanden ist. Die KDPG-Aldolase dagegen ist in dieser Mutante vorhanden; das Enzym kann auch in Rps.sphaeroides 1760-1, welcher in der 6PG-Dehydratase defekt ist, induziert werden. In E.coli (Fradkin und Fraenkel 1971) und Pseudomonas putida (Vincente und Canovas 1973a) soll die KDPG-Aldolase durch ihr Substrat KDPG induziert werden. Jedoch wurde die KDPG-Aldolase auch in einer 6PG-Dehydratase$^-$-Mutante von E.coli noch induziert (Pouyssegur und Stoeber 1972), und in Pseudomonas aeruginosa soll sogar Glycerin die Enzyme des ED-Weges induzieren können (Quay et al.1972, Hylemon und Phibbs 1972).

Das einzige Enzym des Glucoseabbaus, das spezifisch von Glucose induziert wird, ist in Rps.capsulata das Glucosetransportsystem. Zu einem gewissen Teil kann dieses aber auch von Saccharose oder einem Spaltprodukt von Saccharose induziert werden. Die anderen Enzyme des Glucosestoffwechsels können auch von Fructose induziert werden. Somit ist zu erwarten, daß eine Regulation durch Induktion der Enzyme nicht ausreichend ist, und daß zum kontrollierten Abbau von Glucose und Fructose bei gleichzeitiger Verfügbarkeit der beiden Hexosen andere Regulationsmechanismen vorhanden sein müssen.

Repression, Hemmung und Inaktivierung von Enzymen stellen die Kontrollmechanismen dar, die einen ökonomischen Stoffwechsel gewährleisten. Im Katabolismus wird dann in der Regel dasjenige Substrat bevorzugt umgesetzt, welches für den Abbau leichter zugänglich ist; dies ist bei Enterobacteriaceae die Glucose, die dann die Umsetzung anderer Substrate reprimieren oder hemmen kann (Magasanik 1961, McGinnis und Paigen 1969, Paigen und Williams 1970). In Pseudomonas aeruginosa (Ng und Dawes 1973) und Arthrobacter (Krulwich und Ensign 1969, Sokol und Klein 1973) aber wird der Glucosestoffwechsel von TCC-Intermediären, wie Citrat und Succinat reprimiert. In Knallgasbakterien erfolgt mit Wasserstoff sowohl eine Repression der Enzyme des ED-Weges, wie auch eine Hemmung der Fructoseverwertung (Gottschalk 1965, Schlegel und Trüper 1966, Blackkolb und Schlegel 1968, Probst und Schlegel 1973). Vergleichbar damit ist die Hemmung der Glucoseverwertung durch Thiosulfat in Thiobacillus intermedius (Matin und Rittenberg 1970), während bei Thiobacillus novellus umgekehrt Glucose reprimierend auf die Thiosulfatoxidation wirkt (Lejohn et al.1967). In Alcaligenes eutrophus können Fructose und Gluconat gleichzeitig verwertet werden (Bowien und Schlegel 1972a), die Verwertung von Glucose durch eine Glucose verwertende Mutante wird aber von Fructose reprimiert (Schlegel und Trüper 1966). Wie in Arthrobacter crystallopoietes wird dabei das Glucosetransportsystem reprimiert, welches in beiden Organismen eine relativ geringe Affinität für Glucose besitzt (Schlegel und Gottschalk 1965, Krulwich und Ensign 1969). In beiden Bakterienarten wird der Glucoseabbau vollständig unterdrückt.

Auch in Rps.capsulata wird Fructose bevorzugt vor Glucose verwertet. Die Hemmung des Glucoseabbaus ist aber nicht vollständig, sondern der Glucoseverbrauch ist nur stark verringert. Es konnten keine Hinweise dafür gefunden werden, daß die Bevorzugung der Fructose durch eine Repression des Glucosetransportsystems erreicht wird. Vielmehr lassen sich die Versuchsergebnisse mit einer Hemmung des Glucoseabbaus auf der Ebene der Enzyminhibition erklären; und zwar wird die G-6-P-DH durch PEP gehemmt. Während Induktion und Repression eine langsam wirkende Grobregulation ermöglichen, die verhindert, daß Enzyme unökonomisch ohne Bedarf synthetisiert werden, stellt die Hemmung eines katabolischen Enzyms eine rasch wirkende Kontrolle dar, die verhindert, daß bestimmte Intermediärkonzentrationen überschritten werden. Der gleichzeitige, unregulierte Glucose- und Fructoseabbau in Rps. capsulata hätte zur Folge, daß sich von denjenigen Intermediären, die beiden Abbauwegen gemeinsam sind, doppelt so hohe Poolkonzentrationen entwickeln würden; diese könnten von den Folgeenzymen möglicherweise nicht mehr bewältigt werden und würden sich in der Zelle anhäufen.

Eine Anhäufung von Intermediären kann wachstumshemmend wirken. Bei Blockmutanten wurde eine "Toxizität" von angehäuften phosphorylierten Intermediären wiederholt beobachtet; "toxisch" waren z.B. zu hohe Poolkonzentrationen von F-1-P bei 1-PFK$^-$-Mutanten von Aerobacter aerogenes (Kelker et al.1970) und Escherichia coli (Ferenci und Kornberg 1973), von G-6-P in PGI$^-$+G-6-P-DH$^-$-Mutanten von E.coli (Fraenkel 1968a), von KDPG in KDPG-Aldolase$^-$-Mutanten von E.coli (Fradkin und Fraenkel 1971) und Alcaligenes eutrophus (Bowien und Schlegel 1972b) und von Glycerophosphat in Glycerophosphat-DH$^-$-Mutanten von E.coli (Cozzarelli et al.1965). Es konnte zwar gezeigt werden, daß angehäuftes G-6-P die FDPase von E.coli hemmt (Fraenkel 1968a), und daß KDPG-Anhäufung in Alcaligenes eutrophus von einem Absinken des energy charge infolge des ständigen ATP-Verbrauchs begleitet ist (Bowien und Schlegel 1972b), andererseits kann aber auch angenommen werden, daß überhöhte Intermediärkonzentrationen einen allgemein toxischen Effekt haben. Sicher liegt eine solche Toxizität bei Methylglyoxal vor, welches bei fehlender Regulation des Glycerin- oder

Gluconatstoffwechsels von E.coli ausgeschieden wird und zur Abtötung der Kultur führt (Freedberg et al.1971, Rekarte et al.1973).

In der Regel wird das erste Enzym einer Biosynthesekette durch das Endprodukt gehemmt. Durch diese Feedbackhemmung wird verhindert, daß das Produkt überproduziert wird. In katabolischen Sequenzen erfolgt dagegen die Regulation meist durch Energieindikatoren, wie ATP oder energy charge (Atkinson 1969). Sanwal (1970) betonte aber, daß eine Feedbackhemmung auch bei katabolischen Abbauwegen eine Rolle spielt, wenn diese amphibolischen Charakter haben. Der Hexoseabbau stellt eine solche amphibolische Sequenz dar, da der Abbauweg teilweise auch einen anabolischen Weg - für die Gluconeogenese - darstellt. Während die Phosphofructokinase und die G-6-P-DH die Schlüsselenzyme bei katabolischer Funktion sind, ist die FDPase das Schlüsselenzym bei anabolischer Funktion. Eine Schaltstelle für beide, Katabolismus und Anabolismus, ist in der Pyruvatkinase zu sehen; die regulatorischen Eigenschaften dieses Enzyms bestätigen die Annahme einer Schaltstelle auch für phototrophe Bakterien (Klemme 1973 u.1974, Schedel et al.1975). PEP, das Substrat der Pyruvatkinase, muß demnach als das Endprodukt des Hexoseabbaus betrachtet werden. PEP käme also die Rolle eines Feedbackinhibitors von Phosphofructokinase und G-6-P-DH zu. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß PEP sowohl ein allosterischer Inhibitor der 6-PFK aus E.coli (Blangy et al.1968) und Bacillus licheniformis (Marschke und Bernlohr 1973) als auch der G-6-P-DH aus Corynebacterium autotrophicum (Tunail und Schlegel 1972) und Zymomonas mobilis und Z.anaerobica (Opitz 1973) ist.

Auch die G-6-P-DH aus Rps.capsulata ist ein allosterisches Enzym und wird durch PEP gehemmt. Das Schlüsselenzym des Fructoseabbaus dagegen, die 1-PFK, ist kein allosterisches Enzym und wird von PEP nicht gehemmt. Die Hemmung des Glucoseverbrauchs bei gleichzeitigem Fructoseverbrauch kann also mit der Regulationsfunktion des PEP erklärt werden, welches bei gleichzeitigem Glucose- und Fructoseabbau wahrscheinlich angehäuft wird und spezifisch den weiteren Abbau der Glucose durch Inhibition der G-6-P-DH hemmt.

Die G-6-P-DH aus Rps.capsulata wird ferner durch ATP gehemmt. Diese Hemmung wird aber nur mit freiem ATP erzielt, während der MgATP-Komplex kaum eine Hemmwirkung hat. Gleiches gilt auch für die G-6-P-DH aus Pseudomonas aeruginosa (Lessie und Neidhardt 1967), Alcaligenes eutrophus (Blackkolb und Schlegel 1968) und Rps.sphaeroides (Ohmann et al.1970). In Chromatium vinosum wurde ein energy charge von 0,81 - 0,85 und eine totale Mg^{++}-Konzentration von 20 mM gemessen (Miovic und Gibson 1973). Die nicht von Ribosomen gebundenen Mg^{++}-Ionen machen in E.coli ca. 15% der gesamten Mg^{++}-Ionen aus (Lusk et al.1968). Danach ergibt sich also bei einem energy charge von 0,84 , einer freien Mg^{++}-Konzentration von 4 mM und einem Gesamt-ATP-Pool von 5 mM eine freie ATP-Konzentration in der Zelle, die nur 0,15 mM beträgt (Blair 1970). Im Gegensatz zu PEP wird ATP deshalb bei der Hemmung der G-6-P-DH in Rps.capsulata in vivo wohl kaum eine Rolle spielen. Bei Alcaligenes eutrophus konnte dies direkt durch Messung von Poolkonzentrationen gezeigt werden (Bowien et al.1974): In diesem Bakterium ist der Trigger des "Wasserstoffeffekts"(Gottschalk 1965) das NADH, das die G-6-P-DH in vivo hemmt, während das ATP nur in vitro einen Inhibitor darstellt (Blackkolb und Schlegel 1968).

Auch die 1-PFK aus Rps.capsulata wird durch ATP in Konzentrationen höher als 0,4 mM gehemmt; durch Zugabe von Mg^{++}-Ionen läßt sich die Hemmung jedoch wieder aufheben. Das Enzym zeigt keine kooperativen Wechselwirkungen zwischen den Substratbindungsstellen und wird offenbar nicht von Effektoren beeinflußt. In diesen Eigenschaften ähnelt das Enzym der 1-PFK aus Aerobacter aerogenes (Sapico und Anderson 1969), Clostridium pasteurianum (Toit et al. 1972, Von Hugo und Gottschalk 1974b) und Pseudomonas doudoroffii (Baumann und Baumann 1975b). Die 1-PFK hat also auch in anderen Organismen im Gegensatz zur 6-PFK keine regulatorischen Funktionen. Die Art der Regulation von 1-PFK und G-6-P-DH in Rps.capsulata erklärt, warum in diesem Bakterium Fructose das vor Glucose bevorzugte Substrat ist.

Aber nicht alle Mikroorganismen, deren Fructoseabbau über die 1-PFK läuft, ziehen Fructose der Glucose als Substrat vor. In einigen Bakterien wird der Fructoseabbau nämlich bereits an der Kontrollstelle des Transports mit dem PEP-Fructose-PTS reguliert. So konnte an isolierten Membranvesikeln von E.coli eine Hemmung der PEP-abhängigen Hexoseaufnahme durch G-1-P nachgewiesen werden (Kaback 1970). Die Fructoseaufnahme in E.coli-Zellen wird durch die intrazelluläre Konzentration von G-6-P reguliert. Bei gleichzeitigem Angebot von Glucose und Fructose wird in E.coli deshalb der Fructoseverbrauch durch Glucose auf ähnliche Weise gehemmt, wie in Rps.capsulata der Glucoseverbrauch durch Fructose (Kornberg 1972, Amaral und Kornberg 1975). In Vibrio cholerae konnte diauxisches Wachstum mit einem Glucose-Fructose-Gemisch beobachtet werden, wobei Glucose zuerst verbraucht wurde. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, daß Glucose sowohl die Aufnahme der Fructose als auch deren Phosphorylierung durch das PEP-Fructose-PTS hemmt (Bag 1974).

Es stellt sich die Frage, ob auch in Rps.capsulata das PEP-Fructose-PTS regulatorische Eigenschaften besitzt. Eine wesentliche Funktion bei der Regulation des Glucose- und Fructosestoffwechsels ist jedoch nicht zu erwarten, da in diesem Organismus ja Glucose das Substrat ist, dessen Abbau gehemmt wird.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In Rhodopseudomonas capsulata werden Glucose und Fructose über verschiedene Wege abgebaut: Glucose über den ED-Weg und Fructose über den EM-Weg; die 1-PFK ist das Schlüsselenzym des EM-Weges. Diese Schlußfolgerungen gründen sich auf Versuche mit folgenden Methoden:

a) Nachweis von Enzymen in zellfreien Extrakten,
b) Isolierung von Glucose$^-$-Mutanten mit Defekt in der G-6-P-DH,
c) Einbau von 1-^{14}C-Glucose und -Fructose in Pyruvat und Lokalisierung des radioaktiven Kohlenstoffs im Pyruvatmolekül,
d) Radiorespirometrie mit positions-markierter Glucose und Fructose.

2. In Rhodopseudomonas sphaeroides wird Glucose über den ED-Weg abgebaut. Fructose wird bei aerobem und phototrophem Wachstum auf verschiedenen Wegen abgebaut: unter phototrophen Bedingungen hauptsächlich über den EM-Weg und unter aeroben Bedingungen hauptsächlich über den ED-Weg, aber mit einer geringen Beteiligung des EM-Weges. Die Ursache für die Verschiedenheit des Fructoseabbaus läßt sich in der FDP-Aldolase lokalisieren, die nur unter phototrophen Bedingungen eine ausreichend hohe Aktivität besitzt.

3. Rhodopseudomonas capsulata kann Saccharose verwerten. Das Disaccharid wird mit einer im Cytoplasma befindlichen konstitutiven Saccharase gespaltet. Die beiden Produkte Glucose und Fructose werden über den ED-Weg abgebaut.

4. Rhodopseudomonas capsulata verwertet Fructose bevorzugt vor Glucose. Während des Fructoseabbaus ist der Verbrauch von Glucose gehemmt. Als Ursache hierfür wurde eine Feedbackhemmung der G-6-P-DH durch PEP festgestellt. Die G-6-P-DH, das Schlüsselenzym des Glucosestoffwechsels, ist ein Enzym mit sigmoider Substratsättigung, während die 1-PFK, das Schlüsselenzym des Fructosestoffwechsels, ein Enzym mit Michaelis-Menten-Kinetik ist.

LITERATUR

Adelman, R.C.
Ballard, F.J.
Weinhouse, S.
1967 Purification and properties of rat liver fructokinase.
J.Biol.Chem. 242, 3360-3365

Akagi, J.M.
Jackson, G.
1967 Degradation of glucose by proliferating cells of Desulfotomaculum nigrificans.
Appl.Microbiol. 15, 1427-1430

Amaral, D.
Kornberg, H.L.
1975 Regulation of fructose uptake by glucose in Escherichia coli.
J.Gen.Microbiol. 90, 157-168

Anderson, R.L.
Wood, W.A.
1969 Carbohydrate metabolism in microorganisms.
Ann.Rev.Microbiol. 23, 539-578

Andreesen, J.R.
Gottschalk, G.
1969 The occurence of a modified Entner-Doudoroff pathway in Clostridium aceticum.
Arch.Microbiol. 69, 160-170

Atkinson, D.E.
1969 Regulation of enzyme funktion.
Ann.Rev.Microbiol. 23, 47-68

Avigad, G.
Englard, S.
Pifko, S.
1966 5-Keto-D-fructose.
IV. A specific reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate linked reductase from Gluconobacter cerinus.
J.Biol.Chem. 241, 373-378

Bag, J.
1974 Glucose inhibition of the transport and phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of galactose and fructose in Vibrio cholerae.
J.Bact. 118, 764-767

Barnes Jr., E.M.
1972 Respiration-coupled glucose transport in membrane vesicles from Azotobacter vinelandii.
Arch.Biochem.Biophys. 152, 795-799

Baumann, P.
Baumann, L.
1975a Catabolism of D-fructose and D-ribose by Pseudomonas doudoroffii.
I. Physiological studies and mutant analysis.
Arch.Microbiol. 105, 225-240

Baumann, L.
Baumann, P.
1975b Catabolism of D-fructose and D-ribose by Pseudomonas doudoroffii.
II. Properties of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase.
Arch.Microbiol. 105, 241-248

Bell, G.R.
Le Gall, J.
Peck Jr., H.D.
1974 Evidence for the periplasmic location of hydrogenase in Desulfovibrio gigas. J.Bact. 120, 994-997

Bender, R.
Andreesen, J.R.
Gottschalk, G.
1971 2-Keto-3-deoxygluconate, an intermediate in the fermentation of gluconate by Clostridia. J.Bact. 107, 570-573

Bergmeyer, H.U.
Gawehn, K.
Graßl, M.
1974 Enzyme als biochemische Reagenzien. Phosphogluco-Mutase. In: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer, Ed.), Vol.I, 532-533 Verlag Chemie, Weinheim

Bhumiratana, A.
Anderson, R.L.
Costilow, R.N.
1974 Trehalose metabolism by Bacillus popilliae. J.Bact. 119, 484-493

Blackkolb, F.
1968 Zur Regulation des Entner-Doudoroff-Weges in Hydrogenomonas durch molekularen Wasserstoff. Diss.Göttingen

Blackkolb, F.
Schlegel, H.G.
1968 Regulation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hydrogenomonas H16 durch ATP und $NADH_2$. Arch.Microbiol. 63, 177-196

Blair, J.M.
1970 Magnesium, potassium, and the adenylate kinase equilibrium. Magnesium as a feedback signal from the adenine nucleotide pool. Eur.J.Biochem. 13, 384-390

Blangy, D.
Buc, H.
Monod, J.
1968 Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli. J.Mol.Biol. 31, 13-35

Blumenthal, H.J.
Huettner, C.F.
Montiel, F.A.
1974 Comparative aspects of glucose catabolism in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermis. Annales New York Acad.Sci. 236, 105-114

Boehringer 1961,1964,1966 Informationen der Fa.Boehringer

Boehringer
1972 Enzymatische Analysen für die Lebensmittelchemie.

Bowien, B.
1970 Hexoseabbau und Pentosebiosynthese in Hydrogenomonas. Diss.Göttingen

Bowien, B.
Schlegel, H.G.
1972a Isolierung und Charakterisierung katabolischer Defektmutanten von Hydrogenomonas eutropha Stamm H16.
I. Fructose-negative Mutanten
Arch.Microbiol. 87, 203-219

Bowien, B.
Schlegel, H.G.
1972b Isolierung und Charakterisierung katabolischer Defektmutanten von Hydrogenomonas eutropha Stamm H16.
II. Mutanten mit einem Defekt in der 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase.
Arch.Microbiol. 87, 221-234

Bowien, B.
Cook, A.M.
Schlegel, H.G.
1974 Evidence for the in vivo regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in Hydrogenomonas eutropha H16 from measurements of the intracellular concentrations of metabolic intermediates.
Arch.Microbiol. 97, 273-281

Bradfield, A.E.
Flood, A.E.
1950 Soluble carbohydrates of fruit plants.
Nature 166, 264-265

Brown, A.T.
Wittenberger, C.L.
1971 Mechanism for regulating the distribution of glucose carbon between the Embden Meyerhof and hexose-monophosphate pathways in Streptococcus faecalis.
J.Bact. 106, 456-467

Cirillo, V.P.
1968 Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in bakers' yeast.
J.Bact. 95, 603-611

Clark, M.C.
Williams, J.F.
Blackmore, P.F.
1971 The transketolase exchange reaction in vitro.
Biochem.J. 125, 381-384

Conrad, R.
1973 Wege des Hexoseabbaus in phototropher Bakterien.
Diplomarbeit Göttingen

Cooper, R.A.
Anderson, A.
1970 The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in Escherichia coli.
FEBS-Letters 11, 273-276

Cooper, R.A.
1974 Methylglyoxal formation during glucose catabolism by Pseudomonas saccharophila. Identification of methylglyoxal synthase.
Eur.J.Biochem. 44, 81-86

Cozzarelli, N.R.
Koch, J.P.
Hayashi, S.
Lin, E.C.C.
1965 Growth stasis by accumulated L-α-glycerophosphate in Escherichia coli. J.Bact. 90, 1325-1329

Davis, R.A.
Showalter, J.P.
Kern Jr., F.
1975 A simple method for trapping and measuring expired $^{14}CO_2$. Analyt.Biochem. 64, 281-283

Dawes, E.A.
Holmes, W.H.
1958 Metabolism of Sarcina lutea. II. Isotopic evaluation of the routes of glucose utilization. Biochim.Biophys.Acta 29, 82-91

Dawson, P.S.S.
Westlake, D.W.S.
1975 Changes in patterns of respiration and glucose utilization in Candida utilis during the cell cycle: some variations with growth rate. Canad.J.Microbiol. 21, 1013-1019

De Ley, J.
1954 2-Keto-D-gluconate-6-phosphate, a new intermediate in the carbohydrate metabolism of Aerobacter cloacae. Enzymologia 17, 55-68

De Ley, J.
1960 Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in Pseudomonas and related micro-organisms. J.Appl.Bact. 23, 400-441

Dische, Z.
1962 Colour reactions of hexoses. In: Methods in carbohydrate chemistry (R.L.Whistler and M.L.Wolfrom, Eds.), Vol.I, 488-494 Academic Press, New York

Doudoroff, M.
Kaplan, N.
Hassid, W.Z.
1943 Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation. J.Biol.Chem. 148, 67-75

Doudoroff, M.
Barker, H.A.
Hassid, W.Z.
1947 Studies with bacterial sucrose phosphorylase. I. The mechanism of action of sucrose phosphorylase as a glucose-transferring enzyme (transglucosidase). J.Biol.Chem. 168, 725-732

Eagon, R.G.
Wang, C.H.
1962 Dissimilation of glucose and gluconic acid by Pseudomonas natriegens. J.Bact. 83, 879-886

Eidels, L.
Preiss, J.
1970 Carbohydrate metabolism in Rhodopseudomonas capsulata: enzyme titers, glucose metabolism, and polyglucose polymer synthesis. Arch.Biochem.Biophys. 140, 75-89

Eimhjellen, K.E.
Liaaen-Jensen, S.
1964 The biosynthesis of carotenoids in Rhodopseudomonas gelatinosa.
Biochim.Biophys.Acta 82, 21-40

Eisenberg, R.C.
Dobrogosz, W.J.
1967 Gluconate metabolism in Escherichia coli.
J.Bact. 93, 941-945

Eisenberg, R.C.
Butters, S.J.
Quay, S.C.
Friedman, S.B.
1974 Glucose uptake and phosphorylation in Pseudomonas fluorescens.
J.Bact. 120, 147-153

Elsden, S.R.
Ormerod, J.G.
1956 The effect of monofluoroacetate on metabolism of Rhodospirillum rubrum.
Biochem.J. 63, 691-701

Ferenci, T.
Kornberg, H.L.
1971a Pathway of fructose utilization by Escherichia coli.
FEBS-Letters 13, 127-130

Ferenci, T.
Kornberg, H.L.
1971b Role of fructose-1,6-diphosphatase in fructose utilization by Escherichia coli.
FEBS-Letters 14, 360-363

Ferenci, T.
Kornberg, H.L.
Smith, J.
1971 Isolation and properties of a regulatory mutant in the hexose phosphate transport system of Escherichia coli.
FEBS-Letters 13, 133-136

Ferenci, T.
Kornberg, H.L.
1973 The utilization of fructose by Escherichia coli. Properties of a mutant defective in fructose 1-phosphate kinase activity.
Biochem.J. 132, 341-347

Fradkin, J.E.
Fraenkel, D.G.
1971 2-Keto-3-deoxygluconate-6-phosphate aldolase mutants of Escherichia coli.
J.Bact. 108, 1277-1283

Fraenkel, D.G.
1968a The accumulation of glucose 6-phosphate from glucose and its effect in an Escherichia coli mutant lacking phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 243, 6451-6457

Fraenkel, D.G.
1968 The phosphoenolpyruvate-initiated pathway of fructose metabolism in Escherichia coli.
J.Biol.Chem. 243, 6458-6463

Fraenkel, D.G.
Vinopal, R.T.
1973 Carbohydrate metabolism in bacteria.
Ann.Rev.Microbiol. 27, 69-100

Freedberg, W.B. Kistler, W.S. Lin, E.C.C. 1971 Lethal synthesis of methylglyoxal by Escherichia coli during unregulated glycerol metabolism. J.Bact. 103, 137-144

Fromageot, C. Desnuelle, P. 1935 Eine neue Methode zur Bestimmung der Brenztraubensäure. Biochem.Z. 279, 174-183

Gay, P. Rapoport, G. 1970 Etude des mutants depourvus de fructose-1-phosphate kinase chez Bacillus subtilis. C.R.Seances Acad.Sci.(Paris) 271 D, 374-377

Gee, D.L. Baumann, P. Baumann, L. 1975 Enzymes of D-fructose catabolism in species of Beneckea and Photobacterium. Arch.Microbiol. 103, 205-207

Gibson, M.S. Wang, C.H. 1963 Utilization of fructose and glutamate by Rhodospirillum rubrum. Canad.J.Microbiol. 14, 493-498

Gottschalk, G. Eberhardt, U. Schlegel, H.G. 1964 Verwertung von Fructose durch Hydrogenomonas H16 (I.) Arch.Microbiol. 48, 95-108

Gottschalk, G. 1965 Die Verwertung organischer Substrate durch Hydrogenomonas in Gegenwart von molekularem Wasserstoff. Biochem.Z. 341, 260-270

Guerrini, A.M. Cremona, T. Preddie, E.C. 1971 The aldolases of Chlamydomonas reinhardii. Arch.Biochem.Biophys. 146, 249-255

Hanson, T.E. Anderson, R.L. 1966 D-Fructose-1-phosphate kinase, a new enzyme instrumental in the metabolism of D-fructose. J.Biol.Chem. 241, 1644-1645

Hanson, T.E. Anderson, R.L. 1968 Phosphoenolpyruvate-dependent formation of D-fructose-1-phosphate by a four component phosphotransferase system. Proc.Nat.Acad.Sci.(USA) 61, 269-276

Hassid, W.Z. 1960 Biosynthesis of complex saccharides. In: Metabolic Pathways (D.M.Greenberg, Ed.), Vol.I, 251-300 Academic Press, New York

Hengstenberg, W. Egan, J.B. Morse, M.L. 1967 Carbohydrate transport in Staphylococcus aureus. V. The accumulation of phosphorylated carbohydrate derivatives, and evidence for a new enzyme-splitting lactose phosphate. Proc.Nat.Acad.Sci.(USA) 58, 274-279

Hengstenberg, W. Egan, J.B. Morse, M.L.	1968	Carbohydrate transport in Staphylococcus aureus. VI. The nature of the derivatives accumulated. J.Biol.Chem. 243, 1881-1885
Hofmann, E.	1935	Über Beziehungen zwischen Wasserstoffzahl und Abkunft verschiedener Carbohydrasen. Biochem.Z. 275, 320-327
Hylemon, P.B. Phibbs Jr., P.V.	1972	Independent regulation of hexose catabolizing enzymes and glucose transport activity in Pseudomonas aeruginosa. Biochem.Biophys.Res.Comm. 48, 1041-1048
Janda, S. Hedenström, M.	1974	Uptake of disaccharides by the aerobic yeast Rhodotorula glutinis. Hydrolysis of ß-fructosides and trehalose. Arch.Microbiol. 101, 273-280
Julian, G.S. Bulla Jr., L.A.	1971	Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. IV. Glucose catabolism in Bacillus larvae. J.Bact. 108, 828-834
Kaback, H.R.	1970	The transport of sugars across isolated bacterial membranes. In: Current topics in membranes and transport (F.Bronner, A.Kleinzeller, Eds.), Vol.1, 35-99
Kahana, S.E. Lowry, O.H. Schulz, D.W. Passonneau, J.V. Crawford, E.J.	1960	The kinetics of phosphogluco-isomerase. J.Biol.Chem. 235, 2178-2184
Karunairatnam, M.C. Spizizen, J. Gest, H.	1958	Preparation and properties of protoplasts of Rhodospirillum rubrum. Biochim.Biophys.Acta 29, 649-650
Katz, J. Wood, H.G.	1960	The use of glucose-C^{14} for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. J.Biol.Chem. 235, 2165-2177
Katz, J. Wood, H.G.	1963	The use of $C^{14}O_2$ yields from glucose-1- and-6-C^{14} for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. J.Biol.Chem. 238, 517-523
Kelker, N.E. Hanson, T.E. Anderson, R.L.	1970	Alternate pathways of D-fructose metabolism in Aerobacter aerogenes. A specific D-fructokinase and its preferential role in the metabolism of sucrose. J.Biol.Chem. 245, 2060-2065

Kelker, N.E.
Anderson, R.L. 1972 Evidence for the vectorial phosphorylation of D-fructose by intact cells of Aerobacter aerogenes.
J.Bact. 112, 1441-1443

Khoja, T.
Whitton, B.A. 1971 Heterotrophic growth of blue-green algae.
Arch.Microbiol. 79, 280-282

Klemme, J.H. 1973 Allosterische Kontrolle der Pyruvatkinase aus Rhododpirillum rubrum durch anorganisches Phosphat und Zuckerphosphate.
Arch.Microbiol. 90, 305-322

Klemme, J.H. 1974 Modulation by fumarate of a P_i-insensitive pyruvate kinase from Rhodopseudomonas capsulata.
Arch.Microbiol. 100, 57-63

Kornberg, H.L. 1972 Nature and regulation of hexose uptake by Escherichia coli.
In: The molecular basis of biological transport (J.F.Woessner Jr., F.Huijing, Eds.), Miami Winter Symposia, Vol.3, 157-180 . Academic Press,New York

Kornberg, H.L.
Reeves, R.E. 1972 Correlation between hexose transport and phosphotransferase activity in Escherichia coli.
Biochem.J. 126, 1241-1243

Kottel, R.H.
Raj, H.D. 1973 Pathways of carbohydrate metabolism in Microcyclus species.
J.Bact. 113, 341-349

Krulwich, T.A.
Ensign, J.C. 1969 Alteration of glucose metabolism of Arthrobacter crystallopoietes by compounds which induce sphere to rod morphogenesis.
J.Bact. 97, 526-534

Lampen, L.O. 1971 Yeast and Neurospora invertases.
In: The enzymes (P.D.Boyer, Ed.), Vol.5, 291-305 . Academic Press, New York

Landau, B.R.
Katz, J. 1964 A quantitative estimation of the pathway of glucose metabolism in rat adipose tissue in vitro.
J.Biol.Chem. 239, 697-704

Laughon, B.E.
Krieg, N.R. 1974 Sugar catabolism in Aquaspirillum gracile.
J.Bact. 119, 691-697

La Riviere, J.W.M. 1958 On the microbiol metabolism of the tartaric acid isomers. Diss.Delft

Liaaen-Jensen, S. 1962 The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. KGL.Norske Videnskab.Selskabs Skrifter Nr.8

Lebherz, H.G. Rutter, W.J. 1969 Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems. Biochemistry 8, 109-121

Lebherz, H.G. Rutter, W.J. 1973 A class I (Schiff base) fructose diphosphate aldolase of prokaryotic origin. Purification and properties of Micrococcus aerogenes aldolase. J.Biol.Chem. 248, 1650-1659

Lejohn, H.B. Van Caeseele, L. Lees, H. 1967 Catabolite repression in the facultative chemoautotroph Thiobacillus novellus. J.Bact. 94, 1484-1491

Lepesant, J.A. Dedonder, R. 1968 Transport du saccharose chez Bacillus subtilis. C.R.Seances Acad.Sci.(Paris) 267 D, 1109-1112

Lepesant, J.A. Kunst, F. Lepesant-Kejzlarova, J. Dedonder, R. 1972 Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in Bacillus subtilis Marburg. Mol.Gen.Genetics 118, 135-160

Lessie, T. Neidhardt, F.C. 1967 ATP-linked control of Pseudomonas aeruginosa glucose-6-phosphate dehydrogenase. J.Bact. 93, 1337-1345

Ling, K.H. Byrne, W.L. Lardy, H. 1955 Phosphohexokinase. In: Methods in Enzymology (S.P.Colowick, N.O.Kaplan, Eds.), Vol.1, 306-310 Academic Press, New York

Ljungdahl, L. Wood, H.G. Racker, E. Couri, D. 1961 Formation of unequally labelled fructose 6-phosphate by an exchange reaction catalyzed by transaldolase. J.Biol.Chem. 236, 1622-1625

Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the folin-phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275

Lusk, J.E.
Williams, R.J.P.
Kennedy, E.P.
1968 Magnesium and the growth of Escherichia coli.
J.Biol.Chem. 243, 2618-2624

Lynch, T.J.
Henney Jr., H.R.
1973 Carbohydrate metabolism during differentiation (Sclerotization) of the myxomycete Physarum flavicomum.
Arch.Microbiol. 90, 189-198

Magasanik, B.
1961 Catabolite repression.
Cold Spring Harbour Symp.Quant.Biol. 26, 249-256

Mark, C.G.
Romano, A.H.
1971 Properties of hexose transport systems of Aspergillus nidulans.
Biochim.Biophys.Acta 249, 216-226

Marquet, M.
Wagner, M.C.
Delobbe, A.
Gay, P.
Rapoport, G.
1970 Mise en evidence de systemes de phosphotransferases dans le transport du glucose, du fructose et du saccharose chez Bacillus subtilis.
C.R.Seances Acad.Sci.(Paris) 271 D, 449-452

Marrs, B.
Stahl, C.L.
Lien, S.
Gest, H.
1972 Biochemical physiology of a respiration-deficient mutant of the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas capsulata.
Proc.Nat.Acad.Sci.(USA) 69, 916-920

Marschke, C.K.
Bernlohr, R.W.
1973 Purification and characterization of phosphofructokinase of Bacillus licheniformis.
Arch.Biochem.Biophys. 156, 1-16

Matin, A.
Rittenberg, S.C.
1970 Regulation of glucose metabolism in Thiobacillus intermedius.
J.Bact. 104, 239-246

Matin, A.
Rittenberg, S.C.
1971 Enzymes of carbohydrate metabolism in Thiobacillus species.
J.Bact. 107, 179-186

McGill, D.J.
Dawes, E.A.
1971 Glucose and fructose metabolism in Zymomonas anaerobica.
Biochem.J. 125, 1059-1068

McGinnis, J.F.
Paigen, K.
1969 Catabolite inhibition: a general phenomenon in the control of carbohydrate utilization.
J.Bact. 100, 902-913

McKay, L.
Miller III.,A.
Sandine, W.E.
Elliker, P.R.
1970 Mechanisms of lactose utilization by lactic acid Streptococci: enzymatic and genetic analysis.
J.Bact. 102, 804-809

Metzenberg, R.L. 1963 The localization of β-fructofuranosidase in Neurospora.
Biochim.Biophys.Acta 77, 455-465

Midgley, M.
Dawes, E.A. 1973 The regulation of transport of glucose and methyl-α-glucoside in Pseudomonas aeruginosa.
Biochem.J. 132, 141-154

Miller, J.S.
Allen, M.M. 1972 Carbon utilization patterns in the heterotrophic blue-green alga Chlorogloea fritschii.
Arch.Microbiol. 1-12

Miovic, M.L.
Gibson, J. 1973 Nucleotide pools and adenylate energy charge in balanced and unbalanced growth of Chromatium.
J.Bact. 114, 86-95

Mo, Y.
Harris, B.G.
Gracy, R.W. 1973 Triosephosphate isomerase and aldolase from light-and dark-grown Euglena gracilis.
Arch.Biochem.Biophys. 157, 580-587

Muntz, J.A.
Carroll, R.E. 1960 A method for converting glucose to fructose.
J.Biol.Chem. 235, 1258-1260

Neu, H.C.
Heppel, L.A. 1965 The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroplasts.
J.Biol.Chem. 240, 3685-3692

Newsholme, F.A.
Robinson, J.
Taylor, K. 1967 A radiochemical enzymatic activity assay for glycerol kinase and hexokinase.
Biochim.Biophys.Acta 132, 338-346

Ng, F.M.W.
Dawes, E.A. 1973 Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa by Citrate.
Biochem.J. 132, 129-140

Ohmann, E.
Rindt, K.P.
Borris, R. 1969 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in autotrophen Mikroorganismen. I. Die Regulation der Synthese der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Euglena gracilis und Rhodopseudomonas spheroides in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen.
Z.Allg.Mikrobiol. 9, 557-564

Ohmann, E.
Borris, R.
Rindt, K.P.
1970 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in autotrophen Mikroorganismen. II. Die Regulation der Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Euglena gracilis und Rhodopseudomonas spheroides. Z.Allg.Mikrobiol. 10, 37-53

Opitz, R.
1973 Regulation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase einiger Bakterien, die verschiedenen Stoffwechseltypen zugehören.
Diplomarbeit, Göttingen

Orlowski, M.
Goldman, M.
1975 Inactivation of glucose 6-phosphate dehydrohenase during germination and outgrowth of Bacillus cereus T endospores.
Biochem.J. 148, 259-268

Paigen, K.
Williams, B.
1970 Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization.
Advances Microbial Phys. 4, 251-324

Palmer, R.E.
Anderson, R.L.
1972a Cellobiose metabolism in Aerobacter aerogenes. II. Phosphorylation of cellobiose with adenosine 5'-triphosphate by a ß-glucoside kinase.
J.Biol.Chem. 247, 3415-3419

Palmer, R.E.
Anderson, R.L.
1972b Cellobiose metabolism in Aerobacter aerogenes. III. Cleavage of cellobiose monophosphate by a phospho-ß-glucosidase.
J.Biol.Chem. 247, 3420-3423

Palmer, R.E.
Anderson, R.L.
1972c Metabolism of gentiobiose in Aerobacter aerogenes.
J.Bact. 112, 1316-1320

Palumbo, S.A.
Vitlev, L.D.
1969 The influence of temperature on the pathways of glucose catabolism in Pseudomonas fluorescens.
Canad.J.Microbiol. 15, 995-1001

Parr, C.W.
1956 Inhibition of phosphoglucose isomerase.
Nature 178, 1401

Pascal, M.
Kunst, F.
Lepesant, J.A.
Dedonder, R.
1971 Characterization of two sucrase activities in Bacillus subtilis Marburg.
Biochimie (Paris) 53, 1059-1066

Patni, N.J.
Alexander, J.K.
1971a Utilization of glucose by Clostridium thermocellum: presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts.
J.Bact. 105, 220-225

Patni, N.J.
Alexander, J.K.
1971b Catabolism of fructose and mannitol in Clostridium thermocellum: presence of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase, fructose-1-phosphate kinase, phosphoenolpyruvate:mannitol phosphotransferase, and mannitol-1-phosphate dehydrogenase in cell extracts.
J.Bact. 105, 226-231

Phibbs, P.V.
Eagon, R.G.
1970 Transport and phosphorylation of glucose, fructose, and mannitol by Pseudomonas aeruginosa.
Arch.Biochem.Biophys. 138, 470-482

Pfennig, N.
1969 Rhodopseudomonas acidophila, sp.n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria.
J.Bact. 99, 597-602

Pfennig, N.
Lippert, K.D.
1966 Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch.Microbiol. 55, 245-256

Pouyssegur, J.M.
Stoeber, F.R.
1972 Rameau degradatif commun des hexuronates chez Escherichia coli K12. Mecanisme d'induction des enzymes assurant le metabolisme du 2-ceto-3-desoxy-gluconate.
Eur.J.Biochem. 30, 479-494

Prestige, L.S.
Spizizen, J.
1969 Inducible sucrase activity in Bacillus subtilis distinct from levansucrase.
J.Gen.Microbiol. 59, 285-288

Probst, I.
Schlegel, H.G.
1973 Studies on a gram-positive hydrogen bacterium, Nocardia opaca strain 1b. II. Enzyme formation and regulation under the influence of hydrogen or fructose as growth substrates.
Arch.Microbiol. 88, 319-330

Quay, S.C.
Friedman, S.B.
Eisenberg, R.C.
1972 Gluconate regulation of glucose oxidation in Pseudomonas fluorescens.
J.Bact. 112, 291-298

Racker, E.
Schroeder, E.A.R.
1958 The reductive pentosephosphate cycle. II. Specific C_1-phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and seduheptulose-1,7-diphosphate.
Arch.Biochem.Biophys. 74, 326-344

Ramaswamy, K.
Malathi, P.
Caspary, W.F.
Crane, R.K.
1974 Studies on the transport of glucose from disaccharides by hamster small intestine in vitro. II. Characteristics of the disaccharide-related transport system.
Biochim.Biophys.Acta 345, 39-48

Rekarte, U.D.
Zwaig, N.
Isturiz, T. 1973 Accumulation of methylglyoxal in a mutant of Escherichia coli constitutive for gluconate catabolism. J.Bact. 115, 727-731

Rest, R.F.
Robertson, D.C. 1974 Glucose transport in Brucella abortus. J.Bact. 118, 250-258

Rippka, R. 1972 Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. Arch.Microbiol. 87, 93-98

Roberts, B.K.
Midgley, M.
Dawes, E.A. 1973 The metabolism of 2-oxogluconate by Pseudomonas aeruginosa. J.Gen.Microbiol. 78, 319-329

Robertson, D.C.
McCullough, W.G. 1968a The glucose catabolism of the genus Brucella. I. Evaluation of pathways. Arch.Biochem.Biophys. 127, 263-273

Robertson, D.C.
McCullough, W.G. 1968b The glucose catabolism of the genus Brucella. II. Cell free studies with Brucella abortus (S-19). Arch.Biochem.Biophys. 127, 445-456

Robra, K.H. 1971 Optimierung der Begasung in Submerskulturen von Hydrogenomonas eutropha H16 mit H_2 und O_2 und enzymatische KDPG-Synthese. Diss.Göttingen

Romano, A.H.
Eberhard, S.J.
Dingel, S.L.
McDowell, T.D. 1970 Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. J.Bact. 104, 808-813

Romano, A.H.
Van Vranken, W.J.
Preisand, P.
Brustolon, M. 1975 Regulation of the Thiobacillus intermedius glucose uptake system by thiosulfate. J.Bact. 121, 577-582

Rose, I.A.
Kellermeyer, R.
Stjernholm, R.
Wood, H.G. 1962 The distribution of C^{14} in glycogen from deuterated glycerol-C^{14} as a measure of the effectiveness of triosephosphate isomerase in vivo. J.Biol.Chem. 237, 3325-3331

Roseman, S. 1972 A bacterial phosphotransferase system and its role in sugar transport. In: The molecular basis of biological transport (J.F.Woessner Jr., F.Huijing, Eds.), Miami Winter Symposia, Vol.3, 181-218 . Academic Press, New York

Russell, G.K. Gibbs, M.	1966	Regulation of photosynthetic capacity in Chlamydomonas mundana. Plant Physiol. 41, 885-890
Saier Jr., M.H. Feucht, B.U. Roseman, S.	1971	Phosphoenolpyruvate-dependent fructose phosphorylation in photosynthetic bacteria. J.Biol.Chem. 246, 7819-7821
Sanwal, B.D.	1970	Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria. Bact.Rev. 34, 20-39
Sapico, V. Hanson, T.E. Walter, R.W. Anderson, R.L.	1968	Metabolism of D-fructose in Aerobacter aerogenes:analysis of mutants lacking D-fructose 6-phosphate kinase and D-fructose 1,6-diphosphatase. J.Bact. 96, 51-54
Sapico, V. Anderson, R.L.	1969	D-Fructose 1-phosphate kinase and D-fructose 6-phosphate kinase from Aerobacter aerogenes. A comparative study of regulatory properties. J.Biol.Chem. 244, 6280-6288
Schedel, M. Klemme, J.H. Schlegel, H.G.	1975	Regulation of C_3-enzymes in facultative phototrophic bacteria. The cold-labile pyruvate kinase of Rhodopseudomonas spheroides. Arch.Microbiol. 103, 237-245
Schlegel, H.G. Lafferty, R. Stellmach-Helwig, R.	1961	Quantitative Messungen über den CO_2-Einbau an organotrophen Bakterien. Arch.Microbiol. 38, 55-72
Schlegel, H.G. Gottschalk, G.	1965	Verwertung von Glucose durch eine Mutante von Hydrogenomonas H16. Biochem.Z. 341, 249-259
Schlegel, H.G. Trüper, H.G.	1966	Repression of enzyme formation in Hydrogenomonas strain $H16G^+$ by molecular hydrogen and by fructose. Ant.van Leeuwenhoek 32, 277-292
Schmidt, K. Liaaen-Jensen, S. Schlegel, H.G.	1963	Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch.Microbiol. 46, 117-126
Schmidt, K.	1971	Carotenoids of purple nonsulfur bacteria. Composition and biosynthesis of the carotenoids of some strains of Rhodopseudomonas acidophila, Rhodospirillum tenue and Rhodocyclus purpureus. Arch.Microbiol. 77, 231-238

Serrano, R. Reeves, R.E.	1974	Glucose transport in Entamoeba histolytica. Biochem.J. 144, 43-48
Sobol, M.D. Krulwich, T.A.	1973	Metabolism of D-fructose by Arthrobacter pyricinolis. J.Bact. 113, 907-913
Sokol, R.A. Klein, D.A.	1973	Glucose utilization dependence on preferred carbon-source growth in an Arthrobacter sp. Canad.J.Microbiol. 19, 541-543
Stackebrandt, E. Kandler, O.	1974	Biochemisch-taxonomische Untersuchung an der Gattung Cellulomonas. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 228, 128-135
Stanier, R.Y. Doudoroff, M. Kunisawa, R. Contopoulou, R.	1958	The role of organic substrates in bacterial photosynthesis. Proc.Nat.Acad.Sci.(USA) 45, 1246-1260
Stanier, R.Y. Kunisawa, R. Mandel, M. Cohen-Bazire, G.	1971	Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). Bact.Rev. 35, 171-205
Stern, I.J. Wang, C.H. Gilmour, C.M.	1960	Comparative catabolism of carbohydrates in Pseudomonas species. J.Bact. 79, 601-611
Still, G.G. Wang, C.H.	1964	Glucose catabolism in Azotobacter vinelandii. Arch.Biochem.Biophys. 105, 126-132
Stribling, D. Perham, R.N.	1973	Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from Escherichia coli (Crookes'strain). Biochem.J. 131, 833-841
Sutton, D.D. Lampen, J.O.	1962	Localization of sucrose and maltose fermenting systems in Saccharomyces cerevisiae. Biochim.Biophys.Acta 56, 303-312
Szymona, M. Doudoroff, M.	1960	Carbohydrate metabolism in Rhodopseudomonas spheroides. J.Gen.Microbiol. 22, 167-183
Thauer, R.K. Rupprecht, E. Jungermann, K.	1970	Separation of ^{14}C-formate from CO_2-fixation metabolites by isoionic-exchange chromatography. Analyt.Biochem. 38, 461-468

Thiele, H.H. 1968 Die Verwertung einfacher organischer Substrate durch Thiorhodaceae. Arch.Microbiol. 60, 124-138

Toit, P.J.du
Potgieter, D.J.J.
De Villiers, V. 1972 A study of the properties of 1-phosphofructokinase isolated from Clostridium pasteurianum. Enzymologia 43, 285-300

Tunail, N.
Schlegel, H.G. 1972 Phosphoenolpyruvate, a new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochem.Biophys.Res.Comm. 49, 1554-1560

Vincente, M.
Canovas, J.L. 1973a Regulation of the glucolytic enzymes in Pseudomonas putida. Arch.Microbiol. 93, 53-64

Vincente, M.
Canovas, J.L. 1973b Glucolysis in Pseudomonas putida: physiological role of alternative routes from the analysis of defective mutants. J.Bact. 116, 908-914

Von Hugo, H.
Gottschalk, G. 1974a Distribution of 1-phosphofructokinase and PEP:fructose phosphotransferase activity in Clostridia. FEBS-Letters 46, 106-108

Von Hugo, H.
Gottschalk, G. 1974b Purification and properties of 1-phosphofructokinase from Clostridium pasteurianum. Eur.J.Biochem. 48, 455-463

Van Niel, C.B. 1944 The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. Bact.Rev. 8, 1-118

Wang, C.H.
Stern, I.
Gilmour, C.M.
Klungsoyr, S.
Reed, D.J.
Bialy, J.J.
Christensen, B.E.
Cheldelin, V.H. 1958 Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. J.Bact. 76, 207-216

Wang, C.H.
Krackov, J.K. 1962 The catabolic fate of glucose in Bacillus subtilis. J.Biol.Chem. 237, 3614-3622

Weimberg, R.
Doudoroff, M. 1954 Studies with three bacterial sucrose phosphorylases. J.Bact. 68, 381-388

White, A.W.
Shilo, M.
1975 Heterotrophic growth of the filamentous blue-green alga Plectonema boryanum.
Arch.Microbiol. 102, 123-127

Willard, J.M.
Schulman, M.
Gibbs, M.
1965 Aldolase in Anacystis nidulans and Rhodopseudomonas spheroides.
Nature 206, 195

Wolfson, E.B.
Sobel, M.E.
Blanco, R.
Krulwich, T.A.
1974 Pathways of D-fructose transport in Arthrobacter pyridinolis.
Arch.Biochem.Biophys. 160, 440-444

Wood, H.G.
Katz, J.
Landau, B.R.
1963 Estimation of pathways of carbohydrate metabolism.
Biochem.Z. 338, 809-847

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof.Dr. H.G. Schlegel für die Anregung zu diesem Thema, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für die mir stets gewährte Unterstützung herzlich danken.

Herrn Prof.Dr. H.J. Knackmuss und Herrn Prof.Dr. N. Pfennig schulde ich Dank für zahlreiche Ratschläge. Herrn Dr. A.M. Cook bin ich dankbar für die vielen anregenden Diskussionen, die ich mit ihm führen durfte.

Mein Dank gilt Herrn R.Opitz für die gute Zusammenarbeit bei der Optimierung der Methode zur Präparation positions-markierter Fructose und bei der Ausarbeitung der Radiorespirometrieversuche. Fräulein Dr. K. Schmidt möchte ich für die Überlassung ihres Arbeitsplatzes und ihre Anleitung zur Isolierung der Carotinoide recht herzlich danken. Bei Dr. Hauska, Bochum, möchte ich mich für die Übersendung einer Literaturstelle bedanken.

LEBENSLAUF

Geboren:	28.2.1949 in Münchberg/Ofr.
Vater:	Herbert Conrad, Autokaufmann
Mutter:	Herta Conrad, geb. Schödel, Hausfrau
Volksschule:	Herbst 1955 bis 1959, St.Wolfgang-Schule, Regensburg
Gymnasium:	Herbst 1959 bis 1968, Albrecht-Altdorfer-Gymnasium, Regensburg, neusprachlicher Zweig; 23.7.1968: Reifeprüfung

Studium:

28.10.1968:	Immatrikulation an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen für das Studienfach Biologie
15. 9.1970:	Vordiplom in Erlangen
16.10.1970:	Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen für das Studienfach Mikrobiologie
16.10.1972:	Mündliche Diplomhauptprüfung mit Mikrobiologie als Hauptfach, Physikalischer Chemie und Physiologischer Chemie als Nebenfächer
12. 7.1973:	Abschluß der Diplomarbeit mit dem Titel: "Wege des Hexoseabbaus in phototrophen Bakterien"
September 1973:	Beginn der experimentellen Arbeit zu vorliegender Dissertation